

JANINE MALUCELLI FAVORITO

**HLA E DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDENTE , RELATO DE TRINTA
PACIENTES**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna,
Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Professor Doutor Ricardo Pasquini**

1999

Ao meu marido,
Luiz Fernando,
com carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ricardo Pasquini, pela orientação do trabalho.

Aos pacientes com DMID que se dispuseram a participar deste trabalho e seus familiares.

Ao Dr. Edgard D'Ávila Niclewisk pela sugestão do tema do trabalho e cooperação .

A Noemi Sarah Pereira, pela ajuda e cooperação principalmente em relação a metodologia usada para técnica do PCR.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VI
RESUMO	VII
 1. INTRODUÇÃO	 8
1.1 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH): ALGUNS ASPECTOS DE SUA ESTRUTURA E FUNÇÃO.....	11
1.2 RESPOSTA IMUNE E SUA RELAÇÃO COM A GENÉTICA NAS DOENÇAS AUTOIMUNES	14
1.2.1 Resposta Imune Normal	14
1.2.2 Genética na Autoimunidade	16
1.2.3 Antígenos Alvo	18
1.2.4 Mecanismos Efetores	20
1.3 CPH E SUSCEPTIBILIDADE AO DMID (DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDENTE)	21
1.4 HETEROGENEIDADE CLÍNICA DO DMID E CPH	28
1.5 GENES PROTETORES PARA DMID	29
1.6 GENES RELACIONADOS COM SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA AO DMID FORA DO CPH	31
 2. OBJETIVOS	 33
 3. JUSTIFICATIVA	 34
 4. MATERIAL E MÉTODOS	 36
4.1 AMOSTRA POPULACIONAL	36
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO	37
4.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	37
4.4 TIPIFICAÇÃO DO GENE HLA-DRB1 PRO PCR-SSO REVERSO.....	38
4.4.1 Reação em Cadeia Polimerase (PCR).....	39

4.4.2 Hibridização.....	40
4.4.3 Lavagens Rigorosas.....	41
4.4.4 Visualização das Reações (Desenvolvimento da cor).....	41
4.4.5 Leitura e Interpretação dos Resultados.....	42
5. RESULTADOS	44
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	53
ANEXO 1. PADRÃO DE REATIVIDADE DOS ALELOS OU GRUPOS ALÉLICOS COM AS SONDAS DO KIT INNO-LIPA PARA TIPIFICAÇÃO HLA-DRB.....	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

01. CARACTERÍSTICAS DOS 30 PACIENTES COM DMID E RESULTADOS DA TIPIFICAÇÃO HLA-DRB1.....	46
02. FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS (EM PORCENTAGEM) DOS ALELOS E GRUPOS ALÉLICOS DRB1 NOS CONTROLES TIPIFICADOS POR MORAES E MORAES,1997.....	47
03. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS (EM PORCENTAGEM) DE GRUPOS ALÉLICOS DO <i>LOCUS</i> DRB1 EM PACIENTES COM DMID (TIPIFICADOS NESTE ESTUDO) E EM CONTROLES (TIPIFICADOS POR MORAES E MORAES, 1997).....	48

RESUMO

O DMID (diabetes mellitus insulino dependente) é uma doença poligênica causada por destruição autoimune das células β produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans. Dentre os *loci* de susceptibilidade, apenas os do complexo principal de histocompatibilidade (CPH), HLA-DR e DQ, foram bem estabelecidos. Trinta pacientes brasileiros não consangüíneos, residentes em Curitiba – Pr com DMID, tiveram seu HLA-DRB1 tipificado por PCR – SSO (*polymerase chain reaction – sequence specific oligonucleotide*). Foi encontrado um predomínio de HLA-DR4 entre estes pacientes, os quais são caucasianos em sua maioria (2 pacientes tem ancestrais japoneses e 1 tem ancestral índio). Os resultados são similares aos da literatura, onde observa-se um predomínio de HLA-DR3 e/ou DR4 entre os pacientes caucasianos.

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus Insulino Dependente (DMID), também denominado Tipo I (National Diabetes Data Group, 1979) resulta do dano do tecido produtor de insulina no pâncreas de um indivíduo susceptível (CASTANO *et al.*, 1990; NERUP *et al.*, 1988; BACH, 1988; PUJOL-BORREL *et al.*, 1989; ROSSINI *et al.*, 1989-90). O processo que leva a destruição nas ilhotas pancreáticas de Langherhans é tido como “autoimune”, embora os antígenos que iniciam o diabetes ainda não tenham sido encontrados. O envolvimento genético no desenvolvimento do DMID está bem estabelecido há décadas, sendo que os estudos familiares ou populacionais mostram a influência dos antígenos HLA no DMID. A seguir, serão apresentados alguns aspectos do CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade) e da resposta imune; os genes relacionados com DMID e qual a utilidade da identificação desses genes para o tratamento do DMID.

Existem evidências experimentais abundantes de que o DMID, tanto em humanos como em modelos animais é uma doença autoimune. As evidências do envolvimento da imunidade na patogênese do DMID vem da descrição de infiltrado mononuclear nas ilhotas (chamado insulite) no pâncreas de pacientes que morreram de complicações precoces da doença (GEPTS, 1965 e 1981); da eficácia da ciclosporina A na preservação da função residual das células beta em pacientes com DMID recém diagnosticado (SIBLEY *et al.*, 1985) e do achado de anticorpos contra células da ilhota - ICA (BOTAZZO *et al.*, 1974), insulina (PALMER *et al.*, 1983) e outras moléculas da célula beta (BAEKKESKOV *et al.*, 1990) que podem ser encontradas no soro de diabéticos e de indivíduos de alto risco para desenvolvimento da doença, mesmo antes do início da mesma.

Pouca informação sobre a patogênese de DMID em humanos é disponível por limitações óbvias como: a herança genética heterogênea, a variação no meio ambiente e a falta de tecido pancreático disponível para estudos histológicos.

A característica marcante do DMID é a destruição quase completa das células beta (secretoras de insulina), com a manutenção das células alfa (secretoras de glucagon) e gama (secretoras de somatostatina) nas ilhotas de Langerhans do pâncreas (FOULIS *et al.*, 1986). A história natural da doença é lenta, devido a destruição gradual das células beta. No início temos um período de pré-diabetes clínico no qual há uma série de anomalias metabólicas seguindo-se do diabetes clínico no qual temos toda sintomatologia decorrente da hiperglicemia, com todos os pacientes dependentes de insulina para manter a vida (ROSSINI *et al.*, 1993).

Imagina-se que a herança genética tenha um efeito predisponente e, como a concordância para a doença é usualmente menor que 50%, mesmo em gêmeos idênticos (BARNETT *et al.*, 1981; JOHNSTON *et al.*, 1983; SRIKANTA *et al.*, 1983; DIB *et al.*, 1986; OLMOS *et al.*, 1988; LESLIE *et al.*, 1988; BEER *et al.*, 1990; KUMAR *et al.*, 1993), além dos alelos herdados, ainda há outros fatores desconhecidos que devem ter um papel na determinação do desenvolvimento do DMID. A identificação dos genes de susceptibilidade para DMID podem melhorar dramaticamente a habilidade para prever e prevenir a doença, permitindo um reconhecimento precoce dos indivíduos com alto risco para DMID através da combinação de testes genéticos e imunológicos.

Várias observações levaram ao reconhecimento do DMID como uma desordem familiar. Entre as famílias temos o fato que aproximadamente um entre vinte parentes de primeiro grau de um paciente com DMID irá desenvolver a doença, enquanto na população branca, quatro por cem; aproximadamente 50% dos gêmeos idênticos são concordantes para a doença. Um irmão gêmeo idêntico a uma pessoa com DMID que tenha dois alelos de alto risco, DR3 e DR4, tem índice de concordância aproximadamente de 100% apesar da estimativa máxima de penetrância genética do diabetes ser em torno de 70%, deve ser enfatizado que 90% dos indivíduos que desenvolvem DMID não tem um parente de primeiro grau com diabetes (VERGI *et al.*, 1995).

Os fatores genéticos não só influenciam a incidência de DMID, mas também a idade na qual o DMID desenvolve-se. A segunda criança na família a desenvolver diabetes não precisa ter nascido antes da primeira desenvolver a doença, para ter manifestação precoce da doença similar a primeira. Isto sugere que fatores ambientais agudos afetando dois irmãos simultaneamente podem não ser importantes na correlação com o tempo de manifestação do diabetes (VERGI *et al.*, 1995).

O gene mais importante de susceptibilidade ao DMID está com quase toda certeza localizado no complexo principal de histocompatibilidade (CPH), porque tem sido estimado que o CPH fornece aproximadamente 60 – 70% de susceptibilidade genética (ROTTER; LANDAW, 1984) e tem um papel importante também nos camundongos diabéticos não obesos (NOD) (CASTANO *et al.*, 1990; HATTORI *et al.*, 1986; IKEMAGI *et al.*, 1993) e nos camundongos BIO BRUINIG - BB (CHAPPELL *et al.*, 1987; BUSE *et al.*, 1984) que são animais modelos para diabetes. Quanto a contribuição dos *loci* secundários, um grande

número de *loci* adicionais tem sido implicados tanto no DMID humano (OWERBACH *et al.*, 1995; FIELD *et al.*, 1994) quanto nos modelos animais relacionados acima (TODD *et al.*, 1991).

Mesmo com a significativa melhora na habilidade para diagnosticar doença ou identificar genes susceptíveis para muitas desordens (TODD *et al.*, 1992), mapear os genes para diabetes é complicado devido ao pequeno efeito potencial individual do *locus* contribuinte que está fora do CPH e pela relativa abundância destes na população geral. Estes fatores fazem com que a contribuição destes *loci* fiquem menos aparentes e portanto a identificação requer a análise de um grande número de pacientes.

Também existem alelos que parecem ser bem raros em pacientes com DMID e por isso são considerados protetores ou associados com resistência ao DMID. A identificação desses genes protetores e o entendimento dos mecanismos pelos quais seus efeitos são exercidos, são igualmente importantes, considerando sua hipotética utilização para terapêutica genética baseada em estratégias preventivas.

1.1 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH) : ALGUNS ASPECTOS DE SUA ESTRUTURA E FUNÇÃO

Nos seres humanos alguns dos genes que codificam os componentes da resposta imune estão situados no braço curto do cromossomo seis juntamente com o CPH (STROMINGER, 1986; JOHNSON *et al.*, 1991). A maioria dos genes do CPH são muito polimórficos, e este polimorfismo é considerado essencial para gerar a grande variedade de respostas imunes

fisiológicas. Muitos estudos mostram que várias doenças autoimunes estão associadas com os alelos dos genes do CPH, e isto também é verdade para o DMID (NEPOM, 1988; NEPOM, ERLICH, 1991).

O complexo principal de histocompatibilidade (CPH) foi assim denominado porque os genes nesta região do genoma (cromossomo 6 em humanos e 17 nos camundongos), determinam a rapidez com a qual os tecidos transplantados são rejeitados. Aproximadamente 3 bilhões de pares de bases de nucleotídeos compõem o genoma humano, destes mais de 3 milhões constituem o CPH. Estes codificam aproximadamente 100 genes, e apenas uma porção deles foi identificada (NEPOM, 1993).

Os produtos gênicos da região CPH, incluem os HLAs (antígenos leucocitários humanos), moléculas glicoproteicas que estão localizadas nas membranas plasmáticas das células. Outros produtos conhecidos, incluem C2 e C4 da via clássica do sistema complemento e o fator properdina (Bf) da via alternativa. Pelo fato da região CPH ser grande em termos genéticos, é provável que proteínas ainda não descobertas sejam codificadas lá. Um número de *loci* foi bem estabelecido e são designados pelas letras A, B, C , DRB1, DRA, DQB1, DQA1, DPA1, DPB1, etc. Foi desenvolvida uma nomenclatura classificando os produtos gênicos do CPH de acordo com a sua função. As moléculas da classe I incluem produtos gênicos dos *loci* HLA A, B, e C; e as de classe II são codificadas pelos genes das sub-regiões DR, DQ e DP. A região da classe III representa as proteínas relacionadas ao sistema complemento dentre outras (NEPOM, 1988).

Os antígenos de superfície da classe I são expressos em todas as células nucleadas e são formados por duas cadeias. A cadeia maior, é um polipeptídeo glicosilado com uma massa molecular de 43 Kd e é codificado no cromossomo 6; a cadeia menor, uma $\beta 2$ microglobulina (massa molecular de 12Kd) é codificada no cromossomo 15. A variabilidade genética é conferida pela cadeia pesada.

A classe I está envolvida na imunidade mediada por células. Estes antígenos são requeridos para o reconhecimento e rejeição de células estranhas ou de células próprias que tenham sido alteradas por infecção viral ou doença maligna. O mecanismo é a ativação de linfócitos T quiescentes, os quais tornam-se capazes de induzir lise celular. Estas células T, chamadas de células T citotóxicas , são ativadas pela exposição ao antígeno associado à molécula HLA. Apenas os linfócitos T com receptores específicos para o complexo antígeno viral e moléculas da classe I serão ativados. Este reconhecimento obrigatório dos antígenos virais associados às moléculas classe I chama-se restrição do CPH e garante que apenas as células que tenham antígeno estranho processado e complexado à molécula de classe I serão lisadas pelo linfócito T citotóxico ativado (NEPOM, 1988).

As moléculas da classe II são equivalentes aos antígenos Ia no sistema murino e são freqüentemente designadas desta forma. Geralmente elas se expressam somente nos linfócitos B, nos macrófagos teciduais ou circulantes, nas células endoteliais e em alguns linfócitos T ativados. Normalmente não estão presentes nas células do tecido conectivo ou células epiteliais, sendo que esta expressão limitada protege contra a ativação inapropriada da célula T e autoimunidade (NEPOM, 1991).

Os antígenos da classe II são constituídos por uma cadeia alfa pesada e uma cadeia beta leve. De maneira análoga à descrita para a ativação das células T citotóxicas, as células T auxiliares são engatilhadas para atividade pelas células que apresentam um antígeno estranho ou um autoantígeno em associação com a classe II.

Ambas, as moléculas da classe I e II podem ser importantes nas reações imunes que caracterizam o desenvolvimento do DMID, todavia o mecanismo é desconhecido. É especulado, por exemplo, que a classe I confira alto risco e a classe II susceptibilidade para DMID através de uma apresentação efetiva do antígeno.

Além disso, a região de histocompatibilidade contém genes para componentes do complemento, para fator de necrose tumoral, para uma proteína de choque térmico, para enzima 21 hidroxilase e para um suposto gene recessivo que determina hemocromatose (O'BRIEN *et al.*, 1990).

1.2. RESPOSTA IMUNE E SUA RELAÇÃO COM A GENÉTICA NAS DOENÇAS AUTOIMUNES

1.2.1 Resposta Imune Normal

De acordo com as evidências atuais, acredita-se que a especificidade do sistema imune seja determinada por receptores de antígenos, tanto nos linfócitos B como T. O receptor da célula B é uma imunoglobulina com a mesma especificidade dos anticorpos que podem ser secretadas por células plasmáticas maduras. As células B podem reconhecer antígenos

solúveis. Os genes para estes anticorpos são criados por um processo aleatório de recombinação, na qual qualquer família de segmentos gênicos variáveis são combinados com segmentos gênicos diversos de imunoglobulinas e então combinados com segmentos gênicos constantes de imunoglobulinas. Assim, cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas são únicas e bilhões de anticorpos diferentes são criados. Estes genes para anticorpos também sofrem um alto grau de mutação, o que aumenta a probabilidade do antígeno ser reconhecido pelos clones de linfócitos B.

Embora as células T tenham um mecanismo genético semelhante ao das células B para geração de sua diversidade de receptores, elas diferem das células B, pois apenas reagem com antígenos processados ligados as moléculas da classe I ou classe II e expressos na superfície das células alvo ou das células apresentadoras, respectivamente. O elemento crucial das células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, é sua habilidade de apresentar os peptídeos antigênicos ligados à fendas das moléculas HLA. O HLA funciona por fixar pequenos peptídeos e apresentá-los as células T, uma vez que estas usualmente reconhecem apenas a porção processada (peptídeo) de um antígeno. As células T expressam um complexo de receptores que inclui o co- receptor CD4 o qual interage com as moléculas classe II (HLA -DR, DP e DQ nos humanos , H2- IA e IE em camundongos) ou o co-receptor CD8 que interage com moléculas da classe I (HLA- A, B e C nos humanos, H2- K e D nos camundongos).

Os genes que codificam para os antígenos HLA da classe II são chamados de genes da resposta imune. São moléculas altamente polimórficas e diferem entre os indivíduos quanto a

seqüência de aminoácidos (NEPOM, 1991 e 1993). Cada seqüência de aminoácidos diferente recebe um número. Estas diferenças são herdadas de maneira mendeliana.

Devido a variabilidade das moléculas HLA entre os indivíduos, pode-se determinar para qual antígeno o indivíduo pode ter resposta e qual doença autoimune ele pode desenvolver.

O sistema imune tem potencial para responder essencialmente para todos os antígenos estranhos, mas também para autoantígenos. Por termos um mecanismo imune efetor capaz de matar células rapidamente, a resposta potencial contra o próprio é uma consequência deste potente sistema imune.

Desta breve revisão, fica claro como as moléculas da classe II são importantes na determinação da resposta imune, nota-se pelo seu nome: genes da resposta imune. A habilidade das moléculas da classe II em ligarem-se a peptídeos antigênicos específicos não só pode, como determina a resposta imune para um dado antígeno. Um exemplo de uma maneira na qual as moléculas da classe II poderiam estar associadas ao diabetes, nos indivíduos DQB1*0301/DR4, seria a cadeia β do DQ ligar-se a um peptídeo derivado da ilhota e então ativar a resposta da célula T para aquele peptídeo.

1.2.2 Genética na Autoimunidade

O conceito de que a autoimunidade desenvolve-se na presença de susceptibilidade genética, em particular em associação com alelos HLA específicos, se aplica para a maioria

das doenças autoimunes em humanos. Não podemos esquecer que um mesmo alelo pode proteger contra uma desordem e estar associado com susceptibilidade a outra; por ex., HLA DR2, DQA1*0102, DQB1*0602 é raro em pacientes DMID, mas é comum na esclerose múltipla (ERLICH *et al.*, 1991). Então, parece que a susceptibilidade codificada por alelos HLA, não influencia totalmente o desenvolvimento da autoimunidade, mas sim a probabilidade para uma desordem específica.

Uma maneira alternativa pela qual os alelos HLA podem determinar susceptibilidade para uma doença autoimune é alterando o repertório de célula T. Isto pode ser particularmente importante para doenças associadas com o que tem sido chamado “superantígenos”, como na Doença de Kawasaki. Os superantígenos ligam-se a toda classe de célula que esteja ligada a famílias específicas ($V\beta$) de receptores da célula T. Por outro lado, os superantígenos ativam um número muito mais elevado de células T, se comparado aos antígenos usuais que apenas interagem com os clones de célula T que tenham um sítio complementar de ligação específica.

Em adição ao seu efeito na apresentação de antígenos, as moléculas da classe II estão relacionadas com o repertório de linfócitos T em camundongos normais. Os camundongos que expressam uma molécula análoga do DR (denominada I-E), deletam uma série de linfócitos T que carregam determinadas famílias de receptores específicos (por ex.: $V\beta 5$, $V\beta 11$). É descrito que os camundongos NOD (não obesos) que desenvolvem DMID tem uma deleção do gene I-E . Então, levanta-se a hipótese que tal influência do I-E no repertório de receptores da célula T conte para o efeito protetor deste gene nos camundongos NOD. Outros estudos sugerem que o alvo nas ilhotas destes camundongos não depende da limitada

presença de receptores V β na célula T, e que o efeito potente do I-E pode ser secundário a uma apresentação “protetora” do antígeno. Para os camundongos NOD, tanto a introdução de um transgene tomando lugar do gene I-E ausente quanto a de um transgene normal de moléculas I-A, previnem diabetes (NISHIMOTO *et al.*, 1987 e MIYAZA *et al.*, 1990). Esta é a demonstração mais direta da importância destes genes em criar susceptibilidade ao DMID.

Nas doenças autoimunes já estudadas, a concordância entre gêmeos idênticos nunca é 100%, geralmente algo entre 30 e 70% (OLMOS *et al.*, 1988). A concordância entre gêmeos não idênticos é freqüentemente ao redor de 5% e similar ao risco entre irmãos. Finalmente, para a maioria das desordens, a concordância é maior para gêmeos monozigóticos quando comparado com irmãos HLA idênticos. Esta informação sugere que alelos de genes fora do CPH também contribuem para a susceptibilidade à dada doença. Em humanos, por exemplo, a autoimunidade está associada com deficiência de complemento (LES – lupus eritematoso sistêmico), alelos de insulina (DMID) e deficiência de fosforilase nucleotídea (anemia hemolítica). Parece que deficiências do complemento contribuem para autoimunidade por alterar o processo de complexo antígeno-anticorpo. Os polimorfismos no gene da insulina podem influenciar o seu tempo de síntese durante o desenvolvimento embriogênico e futuramente influenciar a “tolerância” para insulina.

1.2.3 Antígenos Alvo

Após muitos anos de estudos, os antígenos foram subdivididos em 3 classes maiores de acordo com a maneira pela qual a apresentação do antígeno ocorre: antígenos exógenos,

antígenos endógenos e superantígenos. Os termos exógeno e endógeno referem-se a procedência e a via intracelular de processamento do antígeno.

Os antígenos exógenos são levados a uma célula por receptores específicos ou mecanismos tipo pinocitose. Estes antígenos são então clivados e acoplados às moléculas da classe II do CPH para apresentação na superfície celular e reconhecimento por células T específicas, CD4 positivas.

Os antígenos endógenos (sintetizados pela célula), são clivados por peptidases num complexo proteossômico e depois acoplados à moléculas da classe I do CPH e então apresentados na superfície celular para reconhecimento por células T CD8 positivas.

Já os superantígenos fixam-se fora da fenda de ligação peptídica das moléculas das classes I e II e ativam famílias inteiras de células T por ligarem-se a seqüências compartilhadas por seus respectivos receptores específicos.

O anticorpo e a resposta da célula T nas desordens autoimunes parecem ser antígeno dirigidas. O grande número de diferentes autoanticorpos para diferentes autoantígenos para uma simples doença autoimune sugere que qualquer que seja a lesão inicial que leve a autoimunidade, a resposta imune espalha-se para uma série de estirpes antigênicas e moléculas do tecido envolvido.

A detecção de famílias de autoanticorpos para cada doença autoimune completa a elucidação de qual autoantígeno é central para a patogênese da doença.

1.2.4 Mecanismos Efetores

Na maioria das desordens imunes, tanto a imunidade humoral quanto a celular contribuem para a patogênese da doença. Doenças mediadas por autoanticorpos incluem anemia hemolítica autoimune, síndrome Eaton-Lambert, pênfigo, doença de Graves.

Os autoanticorpos podem induzir a patologia por bloquear uma função de um receptor específico (por ex., hipotireoidismo), por estimular os receptores (doença de Graves), por citotoxicidade direta (anemia hemolítica), por células oppositoras (anemia hemolítica) e por depósito de complexos imunes (nefrite lúpica).

A imunidade mediada por células está usualmente associada com destruição tecidual (por ex.: DMID, tireoidite), ou por citotoxicidade celular direta ou por mecanismo citotóxico indireto. O modelo clássico de citotoxicidade , aquele que leva a rejeição de tecidos alogênicos, é mediada através de reconhecimento direto de complexos peptídicos antigênicos com moléculas CPH da classe I pelas células T CD8 positivas. A função e expansão dos clones de tais células T depende da ajuda dada pelas células T CD4 positivas as quais respondem ao estímulo antigênico por liberarem uma série de linfocinas, entre elas a interleucina 2. Recentemente as células CD4 positivas foram subdivididas, conforme as linfocinas que as mesmas produzem (WANG, 1993), em 3 grupos de células auxiliaadoras: Th0, Th1 e Th2. As células Th0 constituem uma pequena parte, estão relacionadas com o timo, determinam a produção de autoanticorpos e produzem interleucina e baixos níveis de interferon gama (IFN - γ). As células Th1 determinam a hipersensibilidade tardia e produzem

interleucina 2 e INF - γ . As células Th2 produzem interleucina 4 e estão predominantemente ligadas com a imunidade humoral e elas podem até ser protetoras a destruição autoimune. A matança por célula T citotóxica envolve contato celular direto entre a célula T e a célula alvo.

Um mecanismo adicional de destruição da célula alvo mediada por célula envolve a citotoxicidade indireta mediada por linfócitos CD4 positivos (Th2). Tais linfócitos CD4 positivos, seguindo-se o reconhecimento do antígeno alvo associado às das moléculas do CPH da classe II, secretam linfocinas, que levam a ativação de macrófagos, os quais secretam interferon 1, óxido nítrico e radicais livres. Cada uma dessas moléculas pode matar seletivamente tecidos alvos. Este segundo mecanismo pode ser o responsável pela destruição autoimune da célula β no DMID (BRADLEY *et al.*, 1992) e pela destruição de tecidos xenogênicos transplantados.

Em adição as linfocinas “pró-inflamatórias”, as células T também produzem linfocinas que suprimem a imunidade mediada por células. Tanto o fator de transformação do crescimento β (TGF - β) como a interleucina 4 parecem limitar a destruição imune e a produção dessas moléculas pelas células T expostas para seus antígenos podem ser importantes para regulação imune.

1.3 CPH e Susceptibilidade ao DMID

Os primeiros estudos baseados em técnicas de tipificação sorológica mostravam que muitos antígenos leucocitários humanos (HLA) da classe I, como o HLA-B8, B-18 e B-15

tinham frequência aumentada no DMID (SENGAL *et al.*, 1973; NERUP, 1974; CUDWORTH, 1975).Após o desenvolvimento e refinamento das técnicas de tipificação, vários outros *loci* do CPH foram identificados e estudos posteriores mostraram que os antígenos da classe II estão mais fortemente associados com a susceptibilidade ao DMID do que os da classe I (THOMSEN *et al.*, 1975). A maioria dos pacientes com DMID tem antígenos da classe II HLA-DR3 ou DR4, sendo que aproximadamente 30% são heterozigotos DR3/DR4 (PLATZ *et al.*, 1981; WOLF *et al.*, 1983; BERTRAMS, BAUER, 1984; THOMSON *et al.*, 1988). Devido ao modo sinérgico de ação, a combinação DR3 e DR4 confere o maior risco para DMID (WOLF *et al.*, 1983; THOMSON *et al.*, 1988). A homozigose DR4 oferece um risco de magnitude um pouco menor que a heterozigose DR3/DR4 para DMID e imagina-se que o DR4 haja de maneira dominante. Em contraste, a homozigose DR3 está associada com um risco menor e acredita-se que seu modo de herança seja recessivo (THOMSON *et al.*, 1988; ROTTER *et al.*, 1983). Mas como um todo, os alelos HLA conferem susceptibilidade recessiva, e como será exposto na sequência, a proteção associada com DR2/ DQB1* 0602 é dominante sobre a susceptibilidade.

Por causa do fenômeno de desequilíbrio de ligação existente no braço curto do cromossoma 6, determinados alelos de vários *loci* tendem a ocorrer juntos, com uma frequência maior que a esperada pelo acaso. Este fenômeno levou a identificação de vários haplotipos HLA. Por enquanto, os haplotipos [HLA – B8, DR3 e SCO1], [HLA – B18, DR3, FiC30], [HLA – B15, DR4, SC33] e [HLA – B38, DR4 e SC21], são encontrados com frequência aumentada no DMID (RAUM *et al.*, 1984), mas a identificação do verdadeiro gene da susceptibilidade no contexto não é uma tarefa fácil.

Muitos trabalhos mais recentes tem aclamado que certos alelos da classe II da série DQ estão ainda mais de perto associados com a doença do que os alelos DR (NEPOM *et al.*, 1986; BOHME *et al.*, 1986; BRUSERUD *et al.*, 1987; HENSON *et al.*, 1987). TODD e colaboradores em 1987 mostraram que a presença de ácido aspártico na posição residual 57 da cadeia DQ β está negativamente associado com DMID.

Embora o DMID esteja fortemente associado com CPH, outros estudos sugerem que o mecanismo efetor primário envolvido na destruição da célula beta não esteja restrito a este complexo gênico (NERUP, 1981). A interleucina 1 β (IL - 1 β) é provavelmente a molécula primária da citotoxicidade da célula beta, e os efeitos na célula beta devem ser potencializados pelo fator de necrose tumoral alfa - TNF α (MANDRUP – POULSEN *et al.*, 1987). O papel dos genes da região HLA foi sugerido como sendo quantitativo no sentido de que eles podem influenciar a secreção das citocinas envolvidas (NERUP *et al.*, 1974). A associação de Bf e C4 com DMID tem sido procurada mas é geralmente atribuída ao desequilíbrio de ligação com o HLA- DR4 (BERTRAMS *et al.*, 1982).

Tem sido reconhecidos fatores de susceptibilidade ao DMID fora da região HLA (RISCH, 1987). Os marcadores imunológicos Gm e Km podem ter alguma importância para susceptibilidade ao DMID (FIELD *et al.*, 1986), para susceptibilidade para outras doenças autoimunes e para magnitude de certas respostas imunes (WHITTINGHAM *et al.*, 1984).

Desde que muitos trabalhos tem mostrado que o gene estrutural para o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) está localizado entre os *loci* HLA-B e C4, o TNF α pode ser importante na patogênese do DMID. Esta hipótese é posta de frente a de que a associação entre C4 e

susceptibilidade ao DMID reflita desequilíbrio de ligação entre o gene C4 e o gene controlador da produção de $\text{TNF}\alpha$.

Após o desenvolvimento da tecnologia de seqüenciamento do DNA a habilidade para identificar variantes polimórficas melhorou muito, aumentando assim a possibilidade de se mapear genes para doenças. Os estudos mais recentes que usam esta tecnologia permitiram que os alelos associados com a susceptibilidade fossem identificados com maior precisão e ficou evidenciado que nos haplotipos DR4 o risco genético está fortemente associado com o *locus* HLA-DQ (TODD *et al.*, 1987; HORN *et al.*, 1988; THORBY, RONNINGEN, 1993). Este *locus* codifica para muitas variantes do antígeno HLA-DQ cuja estrutura heterodimérica é tipicamente formada por duas cadeias glicoproteicas (α , β). A função molecular do HLA-DQ (similar às moléculas DR) nas células é a apresentação do antígeno ao receptor das células T. Na sub-região DR a cadeia α é invariável, já na sub-região DQ ambas as cadeias α e β são altamente polimórficas, o que dá origem a inúmeras combinações α , β (JOHNSON *et al.*, 1991; BEGOVICH, 1992). Nos indivíduos brancos portadores de haplotipos DR4, a tipificação DQ levou a identificação de dois alelos, DQB1*0302 e DQB1*0301. Ao redor de 95% dos haplotipos DR4 encontrados em pacientes com DMID apresentam o alelo DQB1*0302, já na população geral, estes dois haplotipos são distribuídos de maneira casual (TODD *et al.*, 1987; HORN *et al.*, 1988). O que diferencia o alelo DQB1*0302 do alelo DQB1*0301 é a ausência do resíduo ácido aspártico na posição 57 no primeiro. Nos haplotipos DR3 encontramos o alelo DQB1*0201 que também tem ausência do ácido aspártico na posição 57. Sendo assim, a coincidência da ausência do ácido aspártico na posição 57 do alelo DQ foi proposta como a explicação molecular para susceptibilidade

genética ao DMID e para o risco aumentado conferido pela heterozigose DR4, DQB1*0302/DR3, DQB1*0201 (TODD *et al.*, 1987; MOREL *et al.*, 1988; TRUCCO, 1992).

A presença do ácido aspártico na posição 57 do gene DQ β tem uma associação fortemente negativa com DMID; os alelos DQ β que são positivamente associados com DMID tem na posição 57 um dos seguintes três aminoácidos : ala (DR3 e DR4), val (DR1) ou ser (DR2) (TODD *et al.*, 1987). A relação da ausência do ácido aspártico na posição 57 com a predisposição ao DMID parece agir de maneira não recessiva, isto é, a proteção do ácido aspártico na posição 57 do DQ β parece ser dominante. A associação da ausência do ácido aspártico na posição 57 está implicada tanto nos haplotipos DR3 como DR4. No entanto, todos os haplotipos DR3 seqüenciados por TODD *et al.*, 1987, tanto dos pacientes quanto dos controles tinham alanina na posição 57. Já nos haplotipos DR4, o ácido aspártico na posição 57 estava substituído por alanina em 94% dos pacientes e em 75% dos controles. MOREL *et al.*, 1988 descreveram em um estudo familiar que 87,5% dos haplotipos não DR3 e não DR4 encontrados em diabéticos são negativos para ácido aspártico na posição 57, quando comparado com 32,4% dos controles. Contudo, a evidência mais forte do envolvimento da ausência do ácido aspártico na posição 57 com DMID, vem particularmente do DR2. Haplotipos DR2 podem ser divididos em subtipos de acordo com o cultivo misto de linfócitos, aqueles que apresentam ácido aspártico na posição 57 da cadeia DQ β e o raro subtipo “AZH” que apresenta serina ao invés de ácido aspártico na posição 57 da cadeia β , sendo este último associado com DMID. (HORN *et al.*, 1988).

Se analisarmos os estudos de HLA e DMID em outras populações (de outras raças), como no japoneses (IKEGAMI, MAKINO, 1993; AWATA *et al.*, 1990; IKEGAMI *et al.*,

1992), nos chineses (PENNY *et al.*, 1990), nos mexicanos-americanos (SANJEIEVI *et al.*, 1993) e nos negros (MIJOVIC , 1991) veremos que a teoria exposta acima não é corroborada. Isto porque, os alelos DQB1 que tem frequência aumentada nos pacientes japoneses possuem o ácido aspártico na posição 57, sendo que também há estudos registrando em pacientes brancos alelos similares (ERLICH *et al.*, 1991). Ainda mais, BAISCH *et al.* em 1990 descreveram outros genótipos DQB1 sem o ácido aspártico na posição 57 como os DQB1*0302 (DR4)/ DQB1*0201 (DR7) , DQB1*0201 (DR3) / DQB1*0201 (DR3) e DQB1*0201 (DR3)/ DQB1*0201 (DR7) que estão associados com um risco muito pequeno para DMID. Entre os brancos a grande maioria dos haplotipos DR3 carregam alelo DQB1*0201, sendo que uma contribuição independente do DQB1*0201 para susceptibilidade ao DMID ainda não foi demonstrada, devemos também observar que a presença deste mesmo alelo , nos haplotipos DR7 e DR9 estão associados com baixo risco para DMID.

Embora o haplotipo DR1 esteja positivamente associado ao DMID, seu efeito predisponente é muito mais fraco do que do DR3 e DR4. Todos os haplotipos DR1 analisados no estudo de MOREL *et al.* não tinham ácido aspártico na posição 57. Os haplotipos DR1 tem valina na posição 57 do DQ β em contraste com alanina do DR3 e DR4 e com ser do DR2 AZH, sendo que estas diferenças poderiam ser consideradas como a razão dos diversos efeitos predisponentes de cada haplotipo.

KHALIL *et al.* (1990) e RONNINGEN *et al.* (1991) relataram alelos do *locus* DQA1, em especial no resíduo arginina na posição 52 da cadeia DQ α também relacionados com a susceptibilidade ao DMID. Este fato pode explicar o risco diferente conferido pelo

DQB1*0201 ao DMID nos haplotipos DR3 e DR4, pois temos diferentes alelos DQA1 (*0501 no DR3, * 0201 no DR7) ligados ao DQB1*0201 em tais haplotipos.

Na evolução foi demonstrado que a transcomplementação das cadeias DQ α e β de haplotipos opostos, aumenta a diversidade dos antígenos da classe II participantes da resposta imune e da contribuição do HLA- DQ na susceptibilidade ao DMID. Este fenômeno tem sido uma explicação para o risco aumentado de DMID em heterozigotos DR4, DQB1*0201/ DR3 DQB1*0201 (NEPOM *et al.*, 1987; e KHALIL *et al.*, 1992).

Outros estudos como os de NEPOM *et al.*, 1990 e de ERLICH *et al.*, 1990 mostraram que alelos do *locus* DRB1 também aumentam a susceptibilidade para DMID, com diferentes riscos relativos reportados para haplotipos DR4/DQB1*0302, diferindo nos *loci* DRB1 e DRB4.

Há descrições na literatura associando o *locus* TAP2 com DMID, permanecendo ainda controverso como o *locus* TAP 2 pode conferir susceptibilidade e resistência ao DMID de maneira epistática com o *locus* DQ. O *locus* TAP2 está localizado centromericamente ao *locus* DQ no braço curto do cromossoma 6. A homozigose para o alelo TAP2*0101, num estudo francês (CAILLAT – ZULMAN *et al.*, 1993), está associada com risco aumentado para DMID independente da susceptibilidade HLA- DQ, mas outros estudos falharam em mostrar tal efeito independente, sugerindo como um desequilíbrio de ligação entre os *loci* HLA – DQ e TAP2.

Mais recentemente, DEGLIEPOSTI *et al.*, 1992 e IKEGAMI *et al.*, 1993, sugeriram em seus estudos, o primeiro em humanos e o segundo em camundongos, que os genes de susceptibilidade podem também estar no CPH central, entre a região da classe I e da classe III onde estão localizados alguns genes do sistema complemento.

1.4 Heterogeneidade Clínica do DMID e CPH

Também temos que lembrar que há uma distribuição diferenciada dos haplotipos HLA de acordo com a idade dos pacientes no início do DMID refletindo uma variedade fenotípica da doença (RONNINGER *et al.*,1991; KARJALAINEN *et al.*, 1989). Por exemplo, CAILLAT-ZUCMAN e seus colaboradores encontraram uma frequência diminuída de DR3, DR4 e de heterozigotos DR3/DR4 entre os pacientes que tiveram início do DMID após 15 anos. Já PUGLIESE analisando 279 pacientes, encontrou frequências significativamente reduzidas de heterozigotos DR3/DR4 apenas em pacientes com início do DMID após 30 anos. Neste grupo também nota-se uma frequência aumentada de homozigotos DR3, que de fato parece correlacionar-se com o lento processo de doença. Fazendo-se a análise imunogenética dos parentes de primeiro grau com anticorpos anti-ilhota – ICA positivos, confirmou-se que DR3 na ausência de DR4/ DQB1*0302 está relacionado com baixo índice de progressão para diabetes.

Pelo exposto até o momento parece que o *locus* DQB1 tem um papel de maior importância na susceptibilidade ao DMID. Todavia, a extensão e significado de suas

contribuições está em investigação e o que temos de mais concreto é o achado de genes do CPH protetores para DMID, e ainda um longo caminho para percorrer para encontrarmos os genes de susceptibilidade.

1.5 Genes Protetores para DMID

Desde que os estudos começaram mostrar que os antígenos HLA estavam relacionados com susceptibilidade ao DMID, foi notado que os haplotipos HLA – DR2 tinham frequência reduzida entre os pacientes com esta doença (THOMSON *et al.*, 1988; ROTTER *et al.*, 1983). Mais tarde, a caracterização dos padrões de ligação DR – DQ nos haplotipos DR2, indica que a proteção genética está mais perto do *locus* DQB1. De fato, dos três alelos DQB1 que estão geralmente ligados ao DR2 em brancos, DQB1*0601, DQB1*0602 e DQB1*0502, apenas o DQB1*0602 está associado negativamente com DMID, O alelo DQB1*0601 é raro em brancos e é relatado como neutro para o risco ao DMID (RONNINGEN *et al.*, 1991; BAISCH *et al.*, 1990). Já o alelo DQB1*0502 é encontrado com frequência associado com DMID na Sardenha e outras áreas mediterrâneas. Existem poucos pacientes DR2 com DMID que tenham outros alelos DQB1 (por ex.: DQB1*0402, *0201, *0301, *0503), que não seja o DQB1* 0206 (ERLICH *et al.*, 1991). Mas o alelo DQB1*0602 é encontrado aproximadamente em 20 – 25 % dos controles brancos e é raramente visto (< 1 %) nos pacientes DMID brancos, pretos ou japoneses (BAISCH *et al.*, 1990).

PUGLIESE em 1994 estudando 182 pacientes brancos com DMID, relatou apenas 1 que carregava DQB1*0602. Outros alelos que tem uma sequência muito similar ao DQB1*0602, como DQB1*0603 e DQB1*0605, também são raramente observados em pacientes com DMID (MIJOVIC, 1993). Parece assim que o DQB1*0602 exerce um efeito protetor dominante, protegendo contra DMID mesmo na presença de alelos de alto risco (BAISCH *et al.*, 1990). Até o momento não é conhecido como os poucos pacientes com DMID descritos na literatura (CAILLAT – ZUCMAN *et al.*, 1992) que tem DQB1*0602, não tem efeito protetor. Especula-se duas justificativas; que apresentem um alelo mutante o qual perdeu seu efeito protetor ou que eles tenham uma forma atípica de DMID como a Síndrome de Wofram onde temos diabetes mellitus, diabete insípido, surdez e não tem etiologia autoimune (FISHMAN *et al.*, 1993). Existe apenas a descrição de um único paciente com DMID que tem o alelo DQB1*0602 e síndrome poliendócrina autoimune do tipo I, a qual está associada com candidíase mucocutânea, hipoparatiroidismo, insuficiência adrenal e outras doenças autoimunes (EISENBARTH e JACKSON, 1992). Neste caso parece que uma deficiência autoimune generalizada possa ter impedido o mecanismo protetor do DQB1*0602 para DMID.

Há descrições também de PUGLIESE e GIANINI (1994, 1992) associando DQB1*0602 a altos títulos de anticorpos contra o ácido glutâmico descarboxilase (GAD) em parentes de primeiro grau de pacientes com diabetes com baixo risco para DMID. Também existe associação negativa do DMID com DQB1*0602 em pacientes com síndrome de Stiff-man (raro tipo de desordem neurológica) que tem origem autoimune e forte resposta humoral para GAD, tendo DMID presente em aproximadamente 30% dos casos (SOLIMENA *et al.*, 1990).

Em estudos que rastreiam imunidade pancreática através da positividade do ICA (anticorpo anti –ilhota), ainda notamos o efeito protetor do DQB1*0602. PUGLIESE descreve 8 parentes de primeiro grau de pacientes com DMID que são ICA positivos e tem DQB1*0602, sendo que nenhum deles desenvolveu diabetes ou alterou a secreção de insulina durante o seguimento, apesar de serem ICA positivos há anos (PUGLIESE *et al.*, 1995).

Se o mecanismo de proteção do DQB1*0602 é ativo ou passivo, ainda não se sabe, mas sua proteção é quase sempre absoluta. Ainda são necessários muitos estudos, e isto é essencial para que no futuro se consiga prevenir a progressão do DMID em indivíduos de alto risco.

1.6 Genes Relacionados com Susceptibilidade e Resistência ao DMID Fora do CPH

Nos seres humanos pouco se sabe sobre genes fora do CPH e DMID porque genes diferentes podem determinar DMID em famílias diferentes e estes genes são muito comuns na população geral, necessitando avaliação de um número muito grande de famílias. Em animais no entanto já foram identificados genes para susceptibilidade ao DMID fora do CPH. Parece que genes CPH podem determinar a autoimunidade em um órgão específico e os genes fora CPH determinam a propensão para autoimunidade.

Muitas pesquisas ao redor do mundo estão concentrando seus esforços na tentativa de identificar os genes. Milhares de famílias com pelo menos dois entes afetados tem sido colecionadas e estão tornando-se disponíveis para estudos, nos EUA temos o HBDI (Human Biologic Data Interchange) na Inglaterra o GBDA (Bristish Diabetic Association).

Existem muitos trabalhos que relatam regiões cromossômicas diferentes que podem estar relacionadas com DMID. Entre eles temos os estudos de FIELD e colaboradores em 1994, descrevendo um *locus* no braço longo do cromossoma 15,(15q 2-6). Tanto OWERBACH como COPEMAN e seus colaboradores, ambos em 1995, consideraram um *locus* no braço longo do cromossoma 2 (2q 3.1 – 2q 3.3). Outros trabalhos como HASHIMOTO e colaboradores em 1994, sugerem a região no braço longo do cromossoma 11 em adição ao gene da insulina no braço curto do cromossoma 11.

Outros trabalhos associam o DMID e o segmento de 4.1 kb do DNA, compreendendo o gene da insulina e regiões adjacentes 5' e 3' (região INS) no cromossoma 11 (11p 15.51) (BELL *et al.*, 1984; PUGLIESE *et al.*, 1993; OWERBACH and GABBAY, 1993).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- A. Fazer revisão bibliográfica dos genes do CPH associados com a susceptibilidade ao DMID
- B. Tipificar o gene HLA –DRB1 num grupo de 30 pacientes com DMID na cidade de Curitiba pelo método PCR – SSOPH (*polymerase chain reaction – sequence specific oligonucleotide hybridization probes*).
- C. Comparar os dados encontrados com os de uma população controle, constituída de brancos brasileiros, publicada por Moraes e Moraes, 1997.

3. JUSTIFICATIVA

Já é um fato bem estabelecido que o antígeno HLA predominante associado com DMID varia nos diferentes grupos raciais. Nos pacientes caucasóides com DMID encontramos uma frequência aumentada de HLA - B8, B15, B18, Cw3, DR3 e DR4 e mesmo entre eles há variações. Por exemplo no norte da Europa predomina DR3 e B8 e no sul (Espanha, Biscaia e Sardenha) predomina B18 (CAMBON-THOMSEN, 1992). Nos tunisianos, assim como nos negros americanos, etiópios e mexicanos predomina DR3 e DR4 com excesso de heterozigose (THOMSON *et al.*, 1988; SVEJGAARD, RYDER, 1989; JENHANI *et al.*, 1989; OTTENHOFF *et al.*, 1987). Nos asiáticos, africanos e latino-americanos parece que apenas HLA - DR3 e DR4 estão associados com o DMID. Nos algerianos, bascos, indianos e chineses há um predomínio de DR3 (MERCIER *et al.*, 1985; CAMBON-de MOUZON *et al.*, 1982; FLETCHER *et al.*, 1988; LEE *et al.*, 1983). Nos japoneses além de DR4, temos DR8 e DR9. E, nos negros sul africanos apenas DR4 (TIWARI *et al.*, 1985). Também há algumas descrições de DR7 e DR9 em alguns negros que parecem estar associados com DMID (APARICIO *et al.*, 1988).

Aqui, no Brasil temos apenas um estudo realizado por Elzirick *et al.* em 1987 na região centro sul que mostrou maior frequência de HLA - A2, B15, DR3 e DR4, numa população constituída de caucasóides europeus, índios brasileiros e negros e outro estudo em andamento na Universidade de Campinas.

A caracterização dos alelos HLA-DRB1 , neste trabalho será mais um relato na literatura a mostrar numa população o alelo predominante que está associado com DMID, contribuindo para a amostragem mundial necessária para o estudo da susceptibilidade genética ao DMID, já que há variação entre as raças e regiões que a população habita.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostra populacional

Trinta pacientes com DMID, residentes na cidade de Curitiba ou arredores em tratamento no consultório de dois endocrinologistas da cidade, que tiveram diagnóstico feito clinicamente, pelas manifestações da síndrome hiperglicêmica, algumas vezes acompanhada de cetoacidose, mas desde início da doença dependentes de insulina para tratamento, foram voluntários para o trabalho.

O grupo foi dividido da seguinte maneira:

Quanto ao grupo étnico: caucasóides e cruzamentos de caucasóides com japoneses ou índios, sendo 2 resultantes do cruzamento de japoneses com caucasóides, 1 de caucasóide com índio e o restante cruzamento entre caucasóides de diferentes origens.

Quanto a idade de início do DMID: 24 tiveram início da doença antes dos 15 anos de idade, 5 tiveram o início da doença entre 15 e 30 anos e 1 após 30 anos.

Para grupo controle foram usados os dados publicados pela Dra. Maria Elisa Moraes e Dr. José Roberto Moraes (Ucla Tissue typing , 1997), que consta de 199 indivíduos brancos brasileiro, pertencentes ao Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea, cujos antecedentes eram principalmente imigrantes italianos e portugueses.

4.2 Coleta das amostras de sangue periférico

As amostras dos 30 pacientes com DMID foram colhidas no período entre agosto e novembro de 1995, conforme os mesmos eram contatados , por telefone ou no retorno para consulta médica . Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue periférico em EDTA de cada indivíduo. Após a coleta, as amostras eram destinadas ao laboratório Genética onde eram imediatamente centrifugadas a 2000 rpm durante 15 minutos, para obtenção do creme leucocitário. Este era mantido a -70°C até que fossem feitas as extrações de DNA.

4.3 Extração e Purificação do DNA Genômico

A eliminação dos eritrócitos, a lise dos leucócitos, a extração do DNA genômico e a determinação de sua concentração foram feitas conforme o protocolo do XI WOKSHOP INTERNACIONAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE, adaptado de MANIATIS, FRITSCH e SAMBROOK (1982).

- Após o descongelamento do creme leucocitário, os eritrócitos foram lisados, por meio de 3 lavagens, em tampão de lise de eritrócitos (SLE) contendo 19mM de tris-HCL pH 7,6 , 5mM de MgCl_2 e 10mM de NaCl.
- Os leucócitos foram recuperados, ao final de cada lavagem, por precipitação, pela centrifugação a 2.000 rpm, durante 15 minutos.
- Estes precipitados de leucócitos foram incubados, durante a noite, a 42°C , após adição de 2mL de SLE e 8 mL de tampão de lise de leucócitos (SLL) contendo 10 mM de tris-HCl pH 7,6 , 10mM de EDTA pH 8,0 , 50mM de NaCl, 0,2% de SDS (p/v) e 2mg de proteinase K,

a fim de que fossem lisados os leucócitos, digeridas as proteínas e liberados os ácidos nucleicos.

- Ao lisado de leucócitos foi acrescentado um volume igual de FCI, composto de 3 partes de fenol, 1 parte de tris-HCl 2M pH 8,0 e 1 parte de clorofórmio + álcool iso-amílico (24:1, v/v).
- Depois da agitação lenta por 10 minutos, a fase aquosa contendo DNA foi separada por centrifugação do FCI contendo resíduos de proteínas, que foi desprezado. A fase aquosa foi tratada mais uma vez desta forma e duas outras com clorofórmio + álcool iso-amílico (24:1, v/v).
- O DNA foi precipitado, pela adição de 200 μ L de NaCl 3M e álcool isopropílico, (v/v), transferido para um tubo limpo e lavado com solução de etanol 70% por 3 vezes. Após a secagem, foi solubilizado em tampão TE (10mM tris HCl pH 7,6 e 1mM de EDTA pH 8,0) e estocado a -70° C.
- A concentração das amostras de DNA foi determinada pela medição da densidade óptica a 260nm.

4.4 Tipificação do gene HLA-DRB1 por PCR-SSO Reverso

A tipificação do gene DRB1 foi realizada pelo método de PCR-SSO reverso utilizando-se o kit INNO-LiPA produzido pela empresa Innogenetics. Esse método baseia-se na amplificação das amostras de DNA através da reação em cadeia da polimerase, com *primers* biotilizados específicos para o gene DRB1, seguida da hibridização reversa com sondas de oligonucleotídeos sequência específicas imobilizadas nas formas de linhas paralelas em tiras

suporte (*line blots*). Após a hibridização adiciona-se estreptavidina marcada com fosfatase alcalina que vai ligar-se aos híbridos biotinilados (sondas / DNA amplificado) previamente formados. A última etapa consiste na visualização das reações de hibridização positivas através da incubação das tiras com um cromógeno constituído de BCIP e NBT, que resulta na formação de um precipitado púrpura/marrom. Este precipitado é decorrente da transferência de grupos fosfato do BCIP para o NBT promovida pela enzima fosfatase alcalina. A identificação dos alelos ou grupos alélicos é feita com base na leitura dos resultados e interpretação do padrão de reatividade de cada amostra de DNA com o conjunto de sondas utilizados.

4.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Inicialmente amplificou-se o segundo exon dos genes DRB utilizando-se *primers* genéricos. Algumas amostras heterozigotas com determinadas combinações de alelos do grupo DR4 foram submetidas a uma nova amplificação com *primers* específicos para este grupo a fim de possibilitar a tipificação de alta resolução (nível alélico).

O protocolo de amplificação foi executado através das seguintes etapas:

- Diluir as amostras de DNA genômico para uma concentração entre 0,01 e 0,02µg/µL.
- Determinar o número de amostras a serem amplificadas (N):
onde N = número de amostras de DNA + um tubo controle negativo (sem DNA) + 1
- Preparar a mistura de amplificação:

água destilada autoclavada	24,8µL x N
tampão de amplificação (kit)	10µL x N
solução de <i>primers</i> (kit)	10µL x N
Taq polimerase 5U/µL (Perkin Elmer)	0,2µL x N (equivalente a 1 U x N)

- Homogeneizar e adicionar 45µL desta mistura em cada tubo de amplificação (PCR).

- Adicionar 5µL (0,05 a 0,1µg) de cada suspensão de DNA genômico aos respectivos tubos de amplificação. Não adicionar DNA ao tubo controle negativo.
- Levar os tubos ao termociclador e iniciar a amplificação de acordo com o seguinte programa:

Nº Ciclos	Temperatura	Tempo	Fase
1	95°C	5 minutos	desnaturação
35	95°C	30 segundos	desnaturação
	58°C	20 segundos	hibridização dos <i>primers</i>
	72°C	30 segundos	extensão dos <i>primers</i>
1	72°C	10 minutos	elongamento

- Após o término do programa fazer o controle da amplificação. Para tal, aplicar 10µL de cada amostra de DNA amplificado nas cavidades de um gel de agarose a 2g%. Os produtos amplificados devem ser visualizados através da presença de bandas únicas com tamanho de aproximadamente 280 pares de base.

4.4.2 Hibridização

O kit INNO-LiPA para a tipificação DRB genérica é constituído de 32 sondas distribuídas em duas tiras de náilon. Uma contém sondas que requerem hibridização a 55°C e a outra a 63°C. O protocolo de hibridização requer as seguintes etapas:

- Separar as tiras de náilon (1 tira para 55°C e 1 para 63°C por amostra) e identificá-las com lápis.

- Dispensar 10µL da solução de desnaturação em cada cavidade do recipiente adequado para hibridização. Usar um recipiente para as tiras de 55° e outro para as de 63°C.
- Adicionar 10µL de cada amostra de DNA amplificado sobre a solução de desnaturação, nas respectivas cavidades, e homogeneizar com auxílio da pipeta. Deixar desnaturar por 5 minutos à temperatura de 20 – 30°C.
- Adicionar 2mL da solução de hibridização pré aquecida a cada cavidade. Misturar através de leve agitação do recipiente. Cuidar para não misturar os conteúdos das diferentes cavidades.
- Submergir as tiras de náilon nos respectivos recipientes de hibridização (55° e 63°C).
- Colocar os recipientes contendo as tiras de sondas nos banhos-maria, ajustados para 55° e 63°C, com agitação de aproximadamente 80rpm. Incubar por 30 minutos.
- Remover os recipientes dos banhos-maria e proceder as lavagens.

4.4.3. Lavagens Rigorosas

- Inclinar os recipientes e aspirar o líquido das cavidades com auxílio de pipeta, preferivelmente acopladas a um aspirador a vácuo.
- Adicionar 2mL da solução de lavagem rigorosa (pré aquecida) a cada cavidade e enxaguar as membranas através da agitação manual dos recipientes por 10 a 20 segundos à temperatura de 20-30°C.
- Finalmente, aspirar a solução e incubar cada tira em 2mL de solução de lavagem rigorosa pré aquecida nos respectivos banhos-maria a 55° e 63°C por 10 minutos.

4.4.4 Visualização das Reações (Desenvolvimento de Cor)

Todas as incubações subsequentes são realizadas em agitador orbital à temperatura de 20-30°C, porque as tiras teste e os líquidos adicionados devem mover-se para cima e para baixo nas cavidades dos recipientes a fim de obter-se uma coloração homogênea.

- Lavar cada tira duas vezes durante 1 minuto usando a solução de enxague diluída.

- Adicionar 2mL do conjugado diluído em cada cavidade do recipiente e incubar por 30 minutos.
- Diluir o substrato cerca de 10 minutos antes do término da incubação com o conjugado.
- Lavar cada tira duas vezes durante 1 minuto usando 2mL da solução de lavagem diluída e lavar mais uma vez usando 2mL de tampão substrato.
- Adicionar 2mL do substrato diluído a cada cavidade e incubar durante 30 minutos.
- Interromper o desenvolvimento de cor através da lavagem das tiras com 2mL de água destilada pelo tempo mínimo de 3 minutos. Repetir esta lavagem mais uma vez.
- Remover as tiras das cavidades, com auxílio de uma pinça, e colocá-las sobre papel absorvente. Deixá-las secar completamente antes de proceder a leitura dos resultados.
- Armazenar as tiras coloridas e secas em ambiente escuro.

4.4.5 Leitura e Interpretação dos Resultados

A seguinte figura ilustra a posição das diferentes sondas de oligonucleotídeos sequência específicas nas tiras INNO-LiPA usadas na tipificação DRB. Uma linha é considerada positiva quando aparecer uma banda de coloração púrpura/marrom ao final do teste

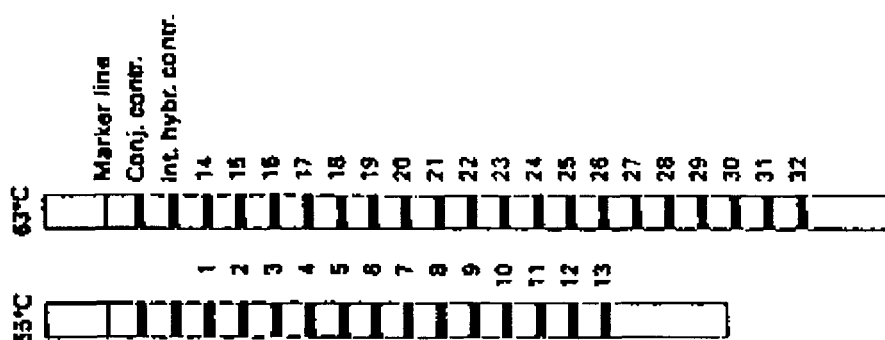


Fig.1 Localização das linhas de marcação (linha preta na tira de 55°C e linha vermelha na tira de 63°C), da linha de controle do conjugado, do controle de hibridização interno e das 32 sondas de DNA sequência específicas nas tiras (55 e 63°C) de INNO-LiPA para tipificação HLA-DRB.

- A linha de controle do conjugado das tiras INNO-LiPA deve ser alinhada com a linha de controle do conjugado sobre o cartão plástico de leitura. Este cartão permite o correto posicionamento das tiras e conseqüentemente uma leitura adequada de cada sonda.
- Checar inicialmente a positividade das linhas controle de modo a validar a leitura das demais linhas individuais correspondentes ao conjunto de sondas utilizado.
- Identificar todos os números de sondas que são positivas para uma determinada amostra de DNA teste nas duas tiras INNO-LiPA.
- Designar o(s) alelo(s) ou grupo(s) alélico(s) presente(s) em cada amostra de DNA através da análise do padrão de reatividade dos mesmos com o conjunto de sondas utilizado (ver anexo I).

5. RESULTADOS

Os resultados da tipificação do *locus* HLA-DRB1, na população de pacientes com DMID analisados neste estudo, estão demonstrados na tabela 1. Foi observado que a grande maioria dos pacientes, ou seja, 23/30 são DRB1*04 e que dentre esses, 15 apresentam dois alelos do grupo DRB1*04 e 8 apresentam um alelo deste grupo e outro pertencente a um dos demais grupos alélicos. Os 2 pacientes que têm ascendência japonesa (pacientes nº 10 e nº 27) e aquele com ascendência índia (paciente nº 19) estão inclusos no grupo tipificado como DRB1*04/ DRB1*04. Dez pacientes são DRB1*03, sendo que 6 apresentam dois alelos deste grupo e 4 apresentam 1 alelo do grupo DRB1*03 e um alelo pertencente a outro grupo. Dentre os pacientes analisados somente 3 são heterozigotos DRB1*03/DRB1*04.

Considerando-se a idade de manifestação da doença (tabela 1), temos 1 paciente com início da mesma após os 30 anos, cujo HLA é DRB1*03011 e DRB1*13011. Dos 5 pacientes com início do diabetes entre 15 e 30 anos, 3 são DRB1*04 e 2 são DRB1*03. Dentre os pacientes que tiveram início antes dos 15 anos, 4 são DRB1*03, 17 são DRB1*04 e somente 3 são DRB1*04/DRB1*03.

Estão descritas na tabela 2 os resultados das frequências fenotípicas, dos alelos ou grupos alélicos HLA-DRB1*, da população usada como controle e tipificada por Moraes e Moraes em 1997.

Comparando-se os resultados dos pacientes tipificados no presente estudo com os do grupo controle (Moraes e Moraes, 1997), observamos que 76,7% dos pacientes são DRB1*04 e que 33,3% DRB1*03 em relação aos controles onde 27,2% são DRB1*04 e 17,1% são DRB1*03 (tabela 3).

Os resultados deste estudo sugerem associações positivas e negativas entre determinados grupos alélicos do gene HLA-DRB1 e DMID, algumas já encontradas em estudos anteriores tais como associação positiva com HLA-DRB1*04 e negativa com DRB1*15. No entanto, uma análise para averiguar a significância estatística das diferenças entre as frequências alélicas do grupo de pacientes e do grupo controle não foi realizada devido ao número reduzido de pacientes tipificados e pelo fato dos controles não serem pareados com os pacientes quanto a etnia.

Tabela 1. Características dos 30 pacientes com DMID e resultados da tipificação HLA-DRB1.

Pacientes Nº Identificação		Idade (anos)	Idade Início do DM (anos)	Locus HLA-DRB1	
1	FZ	15	02	0403	0403
2	FB	18	15	1102	03011
3	AO	20	12	0403	1601
4	GS	24	08	0402	0402
5	MF	18	12	0401	0403
6	GBR	10	04	0403	03011
7	AF	44	40	03011	13011
8	MN	18	10	1101/04	0403
9	ZSC	40	18	0401	0403
10	NF	32	26	0403	0403
11	PFC	42	22	0403	0403
12	MAF	20	08	03011	03011
13	LG	16	06	03011	0401
14	TP	50	16	03011	03011
15	HN	30	10	0401	0402
16	OM	36	09	0801	0401
17	CCT	28	04	0401	0403
18	GO	13	03	1101/04	0401
19	EM	18	13	0401	0403
20	TR	13	05	03011	03011
21	MGL	40	10	0401	0403
22	AEGG	16	06	03011	03011
23	ELFN	16	07	03011	0404
24	LK	40	08	0401	0403
25	AF	21	10	0401	0402
26	RR	26	12	03011	03011
27	LRK	38	09	0403	0403
28	LCF	16	07	0403	0403
29	AA	22	05	0403	0403
30	GM	27	09	1101/04	0401

Tabela 2. Frequências Fenotípicas (em porcentagem) dos alelos e grupos alélicos DRB1 nos controles tipificados por Moraes e Moraes, 1997.

Alelos/ Grupos Alélicos do <i>locus</i> DRB1	Frequência Fenotípica (%)
01	0,5
0101	11,6
0102	6,5
0103	1,0
15	5,0
1501	11,1
1502	1,5
1503	0,5
1601	4,0
1602	3,5
0301	6,3
03011	10,6
0302	0,5
0401	5,5
0402	4,0
0403	3,0
0404	3,5
0405	5,0
0406	0,5
0407	1,5
0408	1,0
0411	3,0
11	4,0
1101	11,1
1102	1,5
1103	2,0
1104	5,5
1201	2,0
1301	15,1
1302	11,6
1303	1,5
1305	1,0
14	0,5
1401	6,0
1402	2,0
1404	0,5
0701	28,6
08	0,5
0801	1,0
0802	0,5
0803	0,5
0804	0,5
0901	2,0
1001	4,0

Tabela 3. Distribuição das frequências fenotípicas (em porcentagem de grupos alélicos do *locus* DRB1 em pacientes com DMID (tipificados neste estudo) e em controles (tipificados por Moraes e Moraes, 1997).

Grupos Alélicos	Pacientes (n=30)	Controles (n=199)
do <i>locus</i> DRB1	%	%
01	0	19,6
15/16 (DR2)	3,3	43,7
15	0	36,2
16	3,3	7,5
03	33,3	17,1
04	76,7	27,2
11/12 (DR5)	13,3	26,1
11	13,3	24,1
12	0	2,0
13/14 (DR6)	3,3	38,2
13	3,3	29,2
14	0	9,0
07	0	28,6
08	3,3	3,0
09	0	2,0
10	0	4,0

8. DISCUSSÃO

O DMID em caucasianos está fortemente associado com HLA - DR3 e HLA - DR4 (ROSSINI, 1993), dificultando em estudos individuais determinar a extensão dos efeitos dos antígenos não-DR3, não DR4 na predisposição à doença.

O modo de herança, se dominante, intermediário ou recessivo é difícil de ser determinado, devido a influência de fatores determinantes ambientais, de genes com penetrância incompleta, e também por causa de uma falta de consenso sobre o número dos *loci* da susceptibilidade para doença (WASSMUTH, LERNMARK, 1989).

O DMID ocorre em populações etnicamente diferentes e é idêntico a doença que ocorre nos caucasianos (JENKINS *et al.*, 1990), mas a associação com os alelos HLA pode ser um pouco diferente, embora geralmente predomine a associação com HLA DR3 e/ou DR4.

Analisando populações diferentes podemos ter uma idéia desta variação, e um fato que pode simplificar a investigação da susceptibilidade ao DMID é estudar populações nas quais os marcadores para doença sejam infreqüentes.

Pelo que já foi exposto, revendo a literatura em relação aos pacientes caucasianos, temos um predomínio quase que geral de DR3 e DR4, sendo que ambos DR3 e DR4 ocorrem em aproximadamente 95% dos pacientes com DMID caucasianos em comparação com 45 –50%

dos controles, estando a heterozigose DR3/DR4 presente em 35 % dos pacientes com DMID e em 1 a 6 % dos controles (ROSSINI, 1993; SVEJGAARD *et al.*, 1986).

Nos pacientes indianos temos uma diferença de acordo com a região. Nos indivíduos norte asiáticos (descendência ariana), temos associação de DR4 com DMID, embora bem menor que nas populações caucasianas; mas predomina a associação do DMID com DR3 (BHATIA *et al.*, 1985; FLETCHER *et al.*, 1988). Em contraste, nos indivíduos do sul (draviniana), geneticamente diferente dos do norte, o DR3 e DR4 ocorrem de maneira igual entre os pacientes diabéticos (SERJEATSON *et al.*, 1987; SVEJGAARD *et al.*, 1989).

Nos japoneses, a presença de DR3 é rara e não está associada com DMID (APARICIO *et al.*, 1988) e os haplotipos DR4 associados com DMID, diferem dos haplotipos DR4 dos caucasianos no *locus* DRB1.

Na população estudada neste trabalho, dos 30 pacientes com DMID, 76,7% são HLA DR4 e destes 8 são heterozigotos apresentando um alelo do grupo DR4 e um alelo pertencente a outro grupo DR , 7 são homozigotos com dois alelos idênticos do grupo DR4 e 8 são heterozigotos com dois alelos diferentes do grupo DR4 . A população é basicamente caucasóide, composta por descendentes de imigrantes europeus, com exceção de 3 pacientes, onde 2 deles além da ascendência caucasóide tem antecedentes japoneses e um paciente também tem ascendência índia; mas todos os 3 são DR4. Neste estudo, diferindo da maioria dos estudos em caucasóides temos uma forte predominância do DR4, com um pouco de DR3.

O estudo colaborativo sobre DMID no 8th *Internacional Histocompatibility Workshop* em 1979-80 (SVEJGAARD *et al.*, 1980), mostrou que o DMID está associado com DR4 em todas as populações estudadas (caucasóides, pretos e japoneses) e com DR3 na maioria das populações. Aproximadamente 90% dos caucasóides eram DR3 e/ou DR4. Neste mesmo estudo também foi mostrado que a associação com HLA pode variar entre os pacientes de acordo com a idade de início da doença, sendo observado que a frequência DR3/DR4 pode ser maior quando o início da doença é antes dos 20 anos. No estudo de CALLAIT-ZUCMAN e col. , 1992, foi descrito que pacientes com início da doença após os 15 anos de idade tem uma porcentagem significativamente maior de genótipo não DR3/ não DR4 e menor da heterozigose DR3/DR4 do que aqueles cujo o início da doença é na infância.

Já o 12th *Internacional Histocompatibility Workshop* em 1997, confirmou o efeito sinérgico da heterozigose DR3/DR4, e mostrou que a homozigose DR3 algumas vezes confere um risco igual ou ainda maior, provavelmente através da participação de outros genes no haplotipo DR3. Também foi mostrado que os vários subtipos DR4 tem um efeito distinto na predisposição ao DMID, o qual é independente do *locus* DQ. Os alelos DRB1*0401, 0402 e 0405 conferem predisposição ao DMID, mas os alelos DRB1*0403, 0404 e 0407 conferem proteção, mesmo quando associados ao alelo DQB1*0302 que confere susceptibilidade ao DMID. Todavia, a proteção dos subtipos DR4 é dominante sobre a susceptibilidade. Esta informação deve ser justificada pela conhecida proteção dominante conferida pelo haplotipo DRB1*15/DQB1*0602. Foram encontrados alelos predisponentes não convencionais em pacientes não-DR3 e não DR4, nomeados DRB1*07, DRB1*08, DRB1*09 e DQB1*0402. Neste mesmo estudo ficou evidenciado que a resposta dos autoanticorpos é heterogênea em relação ao início do DMID e fenotipo HLA. Os anticorpos ICA estão associados com o

fenotipo DR4 e os anticorpos anti GAD estão associados com DR3 ou subtipos protetores DRB1*0403 e 0404. Tais diferenças podem ser explicadas com a noção atual de que anticorpos GAD e IA –2 podem identificar fases e graus de progressão da doença diferentes.

No estudo desses 30 pacientes, 26 (86,7 %) tiveram início da doença antes dos 15 anos, sendo que todos são DR4, DR3 ou heterozigotos para DR3/ DR4, coincidindo com os dados da literatura. Como só 4 (13,3 %) pacientes tiveram manifestação da doença após 15 anos, e também tem alelos DR3 e DR4, não houve uma diferença entre os dois grupos, mas o número de pacientes estudados é muito pequeno.

A complementação deste trabalho com o estudo do HLA– DQ permitirá no futuro uma diferenciação dos haplotipos relacionados com o DMID nesta região, podendo levar a uma melhor compreensão das características imunogenéticas do DMID em nosso país.

8. CONCLUSÃO

Os fatores genéticos conferem susceptibilidade ao processo autoimune que leva a instalação do DMID. As evidências levam a descrição de genes CPH, como também de genes não CPH envolvidos no processo de susceptibilidade ao DMID, embora não seja ainda muito claro como isso ocorre. Os genes CPH parecem determinar ou limitar a autoimunidade em um órgão específico, enquanto os genes não CPH parecem determinar a propensão para autoimunidade.

Atualmente existem vários centros ao redor do mundo, tentando unir esforços na tentativa de identificar os genes envolvidos. Apesar de já estar determinado que a média de penetrância do gene envolvido com a susceptibilidade ao DMID mal exceda os 50%, acredita-se que os marcadores genéticos podem mesmo assim, serem muito úteis, em combinação com testes imunológicos para melhorar a habilidade em predizer o DMID.

O desconhecido “fator ambiental” relacionado com a autoimunidade em indivíduos geneticamente susceptíveis, talvez possa ser responsável pela indução de mutação somática. Supõe-se que tal mutação seja muito difícil de ser identificada, por ocorrer em um número limitado de células, sendo assim, a contribuição genética para a patogênese do DMID se estenderia muito além da susceptibilidade, podendo ser a verdadeira causa.

Mas, no momento, o que temos de mais relevante em relação a genética e DMID, são as evidências que os estudos mais recentes tem mostrado de que alguns alelos podem dar resistência genética ao DMID. Tanto os haplotipos DQB1*0602 como alguns haplotipos INS

estão descritos como protetores para DMID. Sendo que a molécula DQ, DQA1*0102/DQB1*0602 confere uma proteção dominante; e alguns haplotipos INS são protetores quando herdados paternalmente. Devemos lembrar que o haplotipo DR2-DQB1*0602 apesar de conferir resistência ao DMID, confere susceptibilidade a esclerose múltipla, sendo assim é necessário maiores investigações para entendermos o mecanismo pelo qual o DQB1*0602 e o alelo INS B conferem a resistência ao DMID.

Apesar do trabalho atual ter pequeno número de pacientes, encontramos um predomínio de HAL-DR4 se compararmos com o grupo controle, diferindo dos demais estudos mundiais em caucasianos nos quais se nota um predomínio HLA-DR3.

Com o conhecimento dos genes protetores, tem-se a esperança de que estes possam ser usados para genoterapia ou ter seus efeitos mimetizados nos indivíduos de alto risco para DMID.

[illegible]

ANEXO 1. continuação

DRB 1*1302	12			20	27	29	30																								
DRB 1*1303	12	16			27	28	30																								
DRB 1*1304	12	16																													
DRB 1*1305	12		23	20	27	28	30																								
DRB 1*1306	12		23	20	27	28	29																								
DRB 1*1307	12		23	20	27	28	30																								
DRB 1*1308	12																														
DRB 1*1309	12	14		20	28	28	29																								
DRB 1*1310	12			20	28	28	29																								
DRB 1*1311	12		23	23	27	28	29																								
DRB 1*1312	12	16	23	23	27	28	30																								
DRB 1*1313	12																														
DRB 1*1314	12			20	27	28	30																								
DRB 1*1315	9			20	28	28	30																								
DRB 1*1317	12																														
DRB 1*1318	12			20	28	28	30																								
DRB 1*1319	9																														
DRB 1*1401	6	12	18		27	28																									
DRB 1*1402	12			20	25	27	29																								
DRB 1*1403	9			20	26	27	29																								
DRB 1*1404	11	13		18																											
DRB 1*1405	10	12		18																											
DRB 1*1406	9	12		20	25	28																									
DRB 1*1407	12	13		18	27	28																									
DRB 1*1408	12	13		18																											
DRB 1*1409	12			20	25	27																									
DRB 1*1410	6	13		18																											
DRB 1*1411	11	13		18	26	28																									
DRB 1*1412	9	12		20	26	28	29																								
DRB 1*1413	9	16		20	25	27																									
DRB 1*1414	12	13		18																											
DRB 1*1415	11				26	28																									
DRB 1*1416	6	12		20	28	28	30																								
DRB 1*1417	12			20	25	28																									
DRB 1*1418	9	10		18																											
DRB 1*0701			21		27																										
DRB 1*0801	11	16			26	27																									
DRB 1*08021, -022, -07, -09, -11	11				26	27																									
DRB 1*08031, -032	11	16			26	27	29																								
DRB 1*08041	11				26	28																									
DRB 1*0805	11	16	23		27	28																									
DRB 1*0806	11	16			26	28																									
DRB 1*0808	6				26	27																									
DRB 1*0810	11	16			26	28	29																								
DRB 1*09011, -012	11	17	18		27																										
DRB 1*1001			22		27																										
DRB 3*0101	7				27																										
DRB 3*0201	8				28																										
DRB 3*0202	8																														
DRB 3*0301	9				27																										
DRB 4*01011, -03		18	19		28																										
DRB 4*0102			19		26																										
DRB 5*0101	1		23		27																										
DRB 5*0102			23		27																										
DRB 5*0201, -02	2	14			27																										
DRB 5*0203		14			27																										
Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31

8056 9201-X

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APARICIO, J.M.R.; WAKISAKA, A.; MATSUURA, N.; AIZAWA, M. : **HLA-DQ system and insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese: Does it contribute to the developments of IDDM as it does in Caucasians?** Immunogenetics 1988;28: 240-246
- BACH, J.F. : **Mechanisms autoimmunity in insulin dependent diabetes Mellitus.**Clin.Exp. Immunol. 1988; 2:1-8.
- BAISCH, J.M.; WEEKS, T.; GILES, R.; HOOVER, M.; STASTNY, P.; CAPRA, J.D. : **Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-diabetes mellitus.** New Engl. J. Med. 1990; 322: 1836-1841.
- BARNETT, A.H.; EFF, C.; LESLIE, R.D.G.; PYKE, D.A. : **Diabetes in identical twins.** Diabetologia. 1981; 20: 87-93.
- BATHIA, E.; MEHRA, N.K.; TANEJA, V.; VAIYA, M.C.; AHUJA, M.M. : **HLA-DR antigen frequencies in a North Indian type I diabetic population.** Diabetes.1985; 35: 565-567.
- BAUKKESKOV, S.; AANSTOOT, H.J.; CHRISTGAU, S.; REETZ, A.; SOLIMENA, M.; CASCALHO, M.; FOLLI, F.; RICHTER-OLESEN, H.; DE CAMILLI, P. : **Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-Synthesizing enzyme glutamic acid descarboxylase.** Nature. 1970; 347:151-156.
- BEER, S.F.; HEATON, D.A.; ALBERTI, G.; PYKE, D.A.; LESLIE, R.D.G. : **Impaired glucose tolerance precedes but does not predict insulin - dependent diabetes mellitus: a study of identical twins.** Diabetologia. 1990; 33: 497-502.
- BEGOWICH, A.B.; NACCLURE, G.R.; SURAJ, V.C.; *et al.*: **Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region.** F Immunol. 1992; 148:249-258.
- BELL, G.I.; HORITA, S.; KARAM, J.H. : **A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin – dependent diabetes mellitus.** Diabetes. 1984, 33: 176-183.
- BERTRAMS, J.; HINTZEN, U.; SCHLICHT, V.; SCHOLPS, S. : **C4 another marker for type I diabetes.** Lancet. 1982; i: 41.

- BERTRAMS, J.; BAUR, M.P. : **Insulin-dependent diabetes mellitus**. In: ALBERT, ED. BAUR, MP. MAYR, WR. Eds, *Histocompatibility Testing* 1984. Berlin: Springer-Verlag; 1984: 348-358.
- BOHME, J.; CARLSON, B.; WALLIN, J.; MOLLER, E.; PERSSON, B.; PETERSON, PA.; RASH, L. : **Only one DQ β restriction fragment of each DR specificity is associated with insulin-dependent diabetes**. *J. Immunol* 1986; 137: 941-947.
- BOTTAZZO, G.F.; FLORIN-CHRISTENSEN, A.; DONIACH, D.: **Islet cell antibodies in Diabetes Mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies**. *Lancet* 1974; 2:1279-1282.
- BRADLEY, B.J.; HASKINS, K.; LA ROSA, F.G.; LA FFERTY, K.I.: **CD8 T cells are not required for islet destruction induced by CD4⁺ islet specific T-cell clone**. *Diabetes*. 1992; 4: 1603-1608.
- BRUSCRUD, O.; PAULSEN, G.; MARKUSSIN, G.; LUNDIN, K.; THORESEN, AB.; THORSERY, E. : **Genomic HLA - DQ β polymorphism associated with insulin – dependent diabetes mellitus**. *Scand. J. Immunol.* 1987; 25: 235-243.
- BUSE, J.B.; BEM-NUN, A.; KLEIN, K.A.; EISENBARTH, G.S.; SEIDMAN, J.G.; JACKSON, R.A. : **Class I, II, and III major histocompatibility complex gene polymorphism in BB rats**. *Diabetologia*. 1984; 22: 77-79.
- BUSE, J.B.; BEM-NUM, A.; KLEIN, K.A.; EISENBARTH, G.S.; SEIDMAN, J.G.; JACKSON, R.A. : **Specific class II histocompatibility gene polymorphism in BB rats**. *Diabetes*. 1984; 33: 700-703.
- CAILLAT-ZUCMAN, S.; GARCHON, H.J.; TIMISIT, J.; *et al.* : **Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type I insulin-dependent diabetes mellitus**. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2242-2250.
- CAILLAT-ZUCMAN, S.; BERTIN, E.; TIMSIT, J.; BOITARD, C.; ASSAN, R.; BACH, JF.: **Protection from insulin-dependent diabetes mellitus is linked to a peptide transporter gene**. *Eur Immunol.* 1993; 23: 1784-1788.
- CAMBON-DE MOUZON, A.; OHAYON, E.; HAUPTMANN, G.; SEVIN, A.; ABBAL, M.; SOMMER, E.; VERGNES, H.; DUCCOS, J. : **HLA-A, B, C, DR antigens, BF, C4 and glyoxalase I (GLO) polymorphisms in French Basques with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)**. *Tissue Antigens* 1982; 19: 366-379.
- CAMBON-THOMSEN, A.: **HLA population genetics; in Levy-Marchal, Czernichow,**

- Epidemiology and etiology of insulin-dependent diabetes in the young.** *Pediat. Adolesc. Endocrinol.* (Karger, Basel) 1992 , vol 21, pp. 130-157 .
- CASTANO, L.; EISENBARTH, G.S. : **Type I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, Mouse and rat.** *Ann. Rev. Immunol*, 1990; 8:647-79.
- CHAPPEL, C.I.; CHAPPEL, W.R. : **The discovery and development of the BB rat colony: an animal model of spontaneous diabetes mellitus.** *Metabolism*. 1983; 32: 8-10.
- COPEMAN, J.B.; CUCCA, F.; HEARNE, C.M.; *et al.* : **Linkage disequilibrium mapping of a type I diabetes susceptibility gene (IDDM) to chromosome 2q31-q33.** *Nature Genet.* 1995; 9: 80.
- CUDWORTH, A.G.; WOODROW, J.C. : **HLA system and diabetes mellitus.** *Diabetes*. 1975; 24: 345-349.
- DEGLI, M.A.; ABRAHAM, L.J.; MCCANN, V.; SPIES, T.; CHRISTIANSEN, F.T.; DAWKINS, R.L. : **Ancestral haplotypes reveal the role of central MHC in the immunogenic of IDDM.** *Immunogenetics*. 1992; 36: 345-356.
- DIB, S.; VARDI, P.; CONNELLY, J.; EISENBARTH, G.S.; SOELDNER, J.S. : **Immune changes associated with insulin dependent diabetes may remit without causing the disease: a study in identical twins.** *Br Med. F.* 1986; 1670: 292.
- EISENBARTH, G.S.; JACKSON, R.A.: **The immunoendocrinopathy syndromes.** In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W.. Eds 8th ed. Philadelphia: Wb Saunders; 1992: 1555-1556.
- EIZIRIK, D.L.; MONTEIRO, L.M.C.; VOLTARELLI, J.C.; FOSS, M.C.: **Frequency of HLA antigens in a brazilian type I diabetic population.** *Braz. J. Med. Biol. Res* 1987; 20: 533 -537.
- ERLICH, H.Á.; BUGAWAN, T.L.; SCHARF, S.; NEPOM, G.T.; TAIT, B.; GRIFFTH, R.L. : **HLA-DQB sequence polymorphisms and genetic susceptibility to IDDM.** *Diabetes*. 1990; 39: 96-103.
- ERLICH, H.A.; GRIFFTH, R.L.; BUGAWEAN, T.L.; ZIEGLER, R.; ALPER, C.; EISENBARTH, G.S. : **Implication of specific DQB1 alleles in genetic susceptibility and resistance by identification of IDDM siblings with novel HLA-DQB1 allele and unusual DR2 and DR1 haplotypes.** *Diabetes*. 1991; 40: 478-481.
- FERNANDEZ-VIÑA, M.A.; SHUMWAY, W.; STASTNY, P. : **DNA typing for class II antigens with allele specific or group specific amplification II Typing for alleles**

- of the DRw52 associated group.** Hum. Immunol. 1990; 28: 51-64.
- FIELD, L.L.; DIZIER, M.H.; ANDERSON, C.E.; SPENCE, M.A.; ROTTER, J.I.: **HLA dependent diabetes: evidence from pairs of affected siblings.** Am. J. Hum. Genet. 1986; 39:640-647.
- FIELD, L.L.; TOBIAS, R.; MAGNUS, T. : **A locus on chromosome 15q26 (IDDM) produces susceptibility to insulin-dependent mellitus.** Nature Genet. 1994; 8: 189-194.
- FISHMAN, L.; EHRICH, R.M. : **Wolfram syndrome: a report of four new cases and a review of literature.** Diabetes Care. 1986; 9: 405-408.
- FLETCHER, J.; ODUGBESAN, O.; MIJOVIC, E.; BRADWELL, A.R.; BARNETT, A.: **Class II HLA DNA polymorphisms in Type I (insulin-dependent) diabetic patients of North Indian origin.** Diabetologia 1988; 31: 343-350.
- FOULIS, A.K.; LIDDLE, C.N.; FARQUHARSON, M.A; *et al.* : **The histopatology of pancreas in Type I (insulin-dependent) Diabetes Mellitus: a 25 year view of deaths in patients under 20 year of age in United Kingdom.** Diabetologia. 1986; 29: 267-74.
- GAO, X.; MORAES, J.R.; MILLER, S.; STASTNY, P.: **DNA typing for class II HLA antigens allele specific or group specific amplification V. Typing for subset of HLA DR1 and DR 'Br'.** Hum Immunol. 1990; 30: 147-154.
- GEPTS, W.: **Pathologic Anatomy of the pancreas in juvenile diabetes Mellitus.** Diabetes 1965; 14:619-633
- GEPTS, W.; LECOMPTE, P.M.: **The pancreatic islets in diabetes.** Am. J. Med. 1981; 70:105-115.
- GIANANI, R.; PUGLIESE, A.; BONNER-WEIR, S.; *et al.*: **Prognostically significant heterogeneity of cytoplasmic islet cell antibodies in relatives of patients with types I diabetes.** Diabetes. 1992; 41: 347-353.
- HASHIMOTO, L.; HABITA, C.; BERESSI, J.P.; *et al.*: **Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q.** Nature. 1994; 371: 161-164.
- HATTORI, M.; BUSE, J.B.; JACKSON, R.A.; *et al.* : **The NOD mouse: recessive diabetogenic gene within the major histocompatibility complex.** Science. 1986; 231: 733-735.
- HENSON, V.; MACHAREN, N.; RILEY, W.; WAKELAND, E.K.: **Polymorphisms of**

- DQ β genes in HLA-DR4 haplotypes from healthy and diabetes individuals.** Immunogenetics. 1987; 25: 152-160.
- HORN, G.T.; BUGAWAN, T.L.; LONG, C.M.; ERLICH, H.A.: **Allelic sequence variation of the HLA-DQ loci: Relationship to serology and to insulin - dependent diabetes mellitus susceptibility.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 6012-6016.
- IKEGAMI, H.; KAWAGUCHI, Y.; YAMATO, E.; *et al.* : **Analysis by polymerase chain reaction of histocompatibility leukocyte antigen-DR9-linked susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus.** J. Clin Endocrinol Metab. 1992; 75: 1381-1385.
- IKEGAMI, H.; KAWAGUCHI, Y.; UEDA, H.; *et al.* : **MHC-linked diabetogenic gene of the NOD mouse: molecular mapping of the 3' boundary of the diabetogenic region.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993; 192: 677-682.
- IKEGAMI, H.; MAKINO, S. : **Genetic susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus: from NOD mice to humans.** In: Shafir E, ed. Lessons from Animal Diabetes. 4th Ed., Great Britain: Smith-Gordon; 1993: 39-50.
- JENHANI, F.; BARDI, R.; GORGI, Y.; AYED, K.; CHAMMAKI, S.; BOUKRIS, R.: **Polymorphism HLA-A, B, C, DR, C4, BF chez les diabétiques insulinodépendants dans la population tunisienne.** Ann. Biol. Clin. 1989; 47: 23-28.
- JENKINS, D.; MIJOVIC, C.; FLETCHER, J.; JAKOBS, K.H.; BRADWELL, A.R.; BARNETT, A.H.: **Identification of susceptibility loci for type I (insulin-dependent) diabetes by trans-racial gene mapping.** Diabetologia. 1990; 33: 387-395.
- JENKINS, D.; FLETCHER, J.; PENNY, M.A.; MIJOVIC, C.H.; JAKOBS, K.H.; BRADWELL, A.R.; BARNETT, A.H.: **DR B genotyping supports recessive inheritance of DR3 associated susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus.** Ann. J. Hum. Genet. 1991; 49: 49-53.
- JOHNSON, A.H. ; HURLEY, C.K.; HARTZMAN, R.J.; ALPER, C.A.; YUNIS, E.J.: **HLA: The major histocompatibility complex of man.** In: HENRY, J.B. Ed, Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods. 18th ed, Philadelphia: WB Saunders; 1991: 761-794.
- JONHSTON, C.; PYKE, D.A.; CUDWORTH, A.G.; WOLF, E. : **HLA-DR typing in identical Twins with insulin dependent diabetes, difference between concordant and discordant pairs.** Br. Med. J. (Clin. Res. ED). 1983; 286: 253-255.
- KARJALAINEN, J.; SALMELA, P.; ILONEN, J.; SURCEL, H.M.; KNIP, M.: **A comparison of childhood and adult type diabetes Mellitus.** N. Engl. J. Med. 1989; 320: 881-886.

- KHALIL, I.; D'AUROIL, L.; GOBET, M.; *et al.*: **A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA-DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus.** J. Clin. Invest. 1990; 85:1315-1319.
- KHALIL, I.; DESCHAMPS, I.; LEPAGE, V.; AL-DACCAK, R.; DEGOS, R.; HORS, J.: **Dose effect of cis-and trans-encoded HLA-DQ alpha/beta heterodimers in IDDM susceptibility.** Diabetes. 1992; 41: 378-384.
- KUMAR, D.; GEMAYEL, N.S.; DEAPEN, D.; *et al.*: **Genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin.** Diabetes. 1993; 42: 1351-1363.
- LEE, T.D.; ZHAO, T.; CHI, Z.; WONG, H.; SHEN, M.; RODEY, G.: **HLA-A, B and HLA-DR phenotypes in Mainland Chinese patients with diabetes mellitus.** Tissue Antigens 1983; 22: 92-95.
- LESLIE, R.D.G.; MILLWARD, B.A.; HOSKINS, P.; *et al.*: **Prediction of diabetes in non-diabetic identical twins of insulin-dependent diabetic.** Diabetes. 1988; 37: 32.
- MAC DONALD, M.J.; GOTTSCHALL, J.; HUNTER, J.B.; WINTER, K.L.: **HLA-DR4 in insulin-dependent diabetic parents and their diabetic offspring: a clin to dominant inheritance.** Proc. Natl. Acad. SCI. USA. 1986; 83: 7049-7053.
- MANDRUP-POULSEN, T.; BENDTZ, K.; DINARELLO, C.A.; NERUP, J.: **Human tumor necroses factor potentiates human interleukin-1 mediated rat pancreatic β cell cytotoxicity.** J. Immunol. 1987; pp. 4077-4182.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; STNDROOK, J.: **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.
- MERCIER, P.; VALLO, J.J.; VIALETTES, B.; VAGUE, P.: **HLA-A, B, DR antigens and insulin-dependent diabetes in Algerians.** Tissue Antigens 1985; 26: 20-24.
- MIJOVIC, C.H.; JENKINS, D.; JACOBS, K.H.; PENNY, M.A.; FLETCHER, J.Á.; BARNETT, A.H.: **HLA-DQA1 and DQB1 alleles associated with genetic susceptibility to IDDM in a black population.** Diabetes. 1991; 40: 748-753.
- MIYAZAKI, T.; UNO, M.; VEHIRA, M.; *et al.*: **Direct evidence for the contribution of the unique I-A NOD to the development of insulinits in non-obese diabetic mice.** Nature. 1990; 345: 722-4.
- MORAES, M.E.; MORAES, J.R.: **Caucasian Brazilian Normal.** In: TERASAKI, P.I.; GJERTSON, DN. Eds. HLA 1997. Los Angeles UCLA. Tissue Typing Laboratory. 1997 pp. 331-332.

- MOREL, P.A.; DORMAN, J.S.; TODD, J.Á.; MCDEVITT, H.O.; TRUCCO, M.: **Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against type I diabetes: a family study.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 8111-8115.
- NEPOM, B.S.; PALMER, J.; KING, S.J.; HANSEN, J.A.; HOLBECK, S.L.; NEPOM, G.T.: **Specific genomic markers for the HLA-DQ subregion discriminate between DR4+ insulin-dependent diabetes mellitus and DR4+ seropositive juvenile rheumatoid arthritis.** J. Exp. Med. 1986; 164: 345-350.
- NEPOM, B.S.; SCHWARZ, D.; PALMER, J.P.; NEPOM, G.T.: **Transcomplementation of HLA genes IDDM: HLA-DQ alpha – and beta-chains produce hybrid molecules in DR3/DR4 heterozygotes.** Diabetes. 1987; 36:114-117.
- NEPOM, G.T.: **Immunogenetics of HLA-associated diseases.** Concepts Immunopathol. 1988; 37: 1112-1119.
- NEPOM, G.T.; ERLICH, H.: **MHC class-II molecules and autoimmunity.** Annu Rev. Immunol. 1991; 9:493-525.
- NEPOM, G.T. : **Imunogenetics and IDDM.** Diabetes Rev. 1993; 1:93-103
- NERUP, J.; PLATZ, P.; ORTEVED-ANDERSON, O.; *et al.*: **HLA antigens and diabetes mellitus.** Lancet. 1974; 2: 864-866.
- NERUP, J.: **Etiology and pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus: present views and future developments.** In J.M. Martin, of insulin-dependent diabetes mellitus. Raven Press, New York. 1981; pp. 275-288.
- NERUP, J.; MANDRUP-POULSEN, T.; MOLVIG, J.; *et al.*: **Mechanisms of pancreatic B-cell destruction in type I diabetes.** Diabetes Care 1988; 11 (Suppl 1): 16-22.
- NISHIMOTO, H.; KIKUTANI, H.; YAMAMURA, K.; KISHIMOTO, T.: **Prevention of autoimmune insulinitis by expression of I-E molecules in NOD mice.** Nature. 1987; 328: 432-434.
- O'BREN, T.; BARRET, B.; MURRAY, D.M.; *et al.*: **Use fullness of biochemical screening of diabetic patients for hemochromatosis.** Diabetes Care. 1990; 13: 532-53
- OLMOS, P.; HERN, R.A.; HEATON, D.A.; *et al.* : **The significance of the concordance rate for type I (insulin-dependent) diabetes in identical twins.** Diabetologia. 1988; 31: 747-750.
- OTTENHOFF, T.H.M.; MENGISTU, M.; TADESSE, G.; VRIES, R.P.P.; CONVERSE, P.J.: **HLA-DR and DQ antigens in insulin-dependent diabetics in Ethiopia.** Tissue

Antigens 1987;30: 193-197.

OWERBACH, D.; GABBAY, K.H.: **Localization of a Type I diabetes susceptibility locus to the variable tandem repeat flanking the insulin gene.** Diabetes. 1993; 42 : 1708- 1714.

OWERBACH, D.; GABBAY, K.H.: **The HOXD8 locus (2q31) is linked to type I diabetes: interaction with chromosome 6 and 11 disease susceptibility genes.** Diabetes. 1995; 44: 132-136.

PALMER, J.P.; ASPLIN, C.M.; CLEMONS, P.; LYEN, K.; TATPATI, O.; RAGHU, P.K.; PAQUETTE, T.L.: **Insulin antibodies in insulin dependent diabetes before insulin treatment.** Science. 1983; 222:1337-1339.

PENNY, M.A.; JENKINS, D.; MIJOVIC, C.H.; *et al.*: **Susceptibility to IDDM in a Chinese population.** Diabetes. 1992; 41: 914-919.

PLATZ, P.; JAKOBSEN, B.K.; MORLING, N.; *et al.*: **HLA-D and DR antigens in genetic analysis of insulin-dependent diabetes mellitus.** Diabetologia. 1981; 21: 108-115

PUGLIESE, A.; SOLIMENA, M.; AWDEH, Z.L.; *et al.*: **Association of HLA-DQB1*0201 with stiff-man syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77: 1550-1553.

PUGLIESE, A.; GIANANI, R.; EISENBARTH, G.S.; *et al.*: **Genetics of susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes in stiff-man syndrome.** Lancet. 1994; 341: 1027-1028.

PUGLIESE, A.; GIANANI, R.; MOROMISATO, R.; AWDEH, Z.L.; ALPER, C.A.; ERLICH, H.Á.; JACKSON, R.A.; EISENBARTH, G.S.: **HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody positive first degree relatives of patients with insulin-dependent diabetes.** Diabetes. 1995; 44: 608-613

PUJOL-BOVIELL, R.; SOLDIVILLA, G.; BUSCEMA, M.; *et al.*: **Inappropriate expression of HLA class II molecules in endocrine epithelial cells the phenomenon, the new Experimental data and comparison with animal models.** J. Autoimmune. 1989, 2 (suppl): 163-9.

RAUM, D.; AWDEH, Z.; YUNIS, E.J.; ALPER, C.A.; GABBAY, K.H.: **Extended major histocompatibility complex haplotypes in type I diabetes mellitus.** J. Clin. Invest. 1984; 74: 449-454.

RISH, N.: **Assessing the role of HLA- linked and unlinked determinants of disease.** Am. J. Hum. genet. 1987; 40: 1-14.

RONNINGEN, K.S.; SPURKLAND, A.; TAIT, B.D.; *et al.*: **HLA class II associations in insulin-dependent diabetes Mellitus among Blacks, Caucasoids, and Japanese.** In:

- TSUJI, K.; AZAWA, M.; SASAZUKI, T. eds, HLA 1991, Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press; 1991: 713-722.
- RONNINGEN, K.S.; GJERTSEN, H.A.; IWE, T.; SPURKLAND, A.; HANSEN, T.; THORSBY, E. : **Particular HLA-DQ alpha beta heterodimer associated with IDDM susceptibility in both DR4-Dqw4 Japanese and DR4-DQw8/DRw8 whites.** Diabetes. 1991; 40: 759-763.
- ROSSINI, A.A.; MORAES, J.P.; GREINER, D.L. : **The pathogens of autoimmune diabetes.** Curr. Opin. Immunol. 1989-90; 2:598-603.
- ROSSINI, A.A.; GREINER, D.L.; FRIEDMAN, H.P.; MORDES, J.P.: **Immunopathogenesis of Diabetes Mellitus.** Diabetes Rev. 1993; 1: 43-75.
- ROTTER, J.I.; ANDERSON, C.E.; RUBIN, R.; CONGLETO, J.E.; TERASAKI, P.I.; RIMOIN, D.L. : **HLA genotype study of insulin-dependent diabetes, the excess of DR3/DR4 heterozygotes allows rejection of the recessive hypothesis.** Diabetes. 1983; 32: 169-174.
- ROTTER, J.I.; LANDAW, E.M. : **Measuring the genetic contribution of a single locus to a multilocus disease.** Clin. Genet. 1984; 26: 529-542.
- SANJEEVI, C.B.; ZEIDLER, A.; SHAW, S.; *et al.* : **Analysis of HLA-DQA1 and -DQB1 genes in Mexican Americans with insulin-dependent diabetes mellitus.** Tissue Antigens. 1993; 42: 72-77.
- SENGAL, D.P.; BLAJCHMANN, M.A.: **Histocompatibility (HLA-A) antigens, lymphotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus.** Diabetes. 1973; 22: 345 -349.
- SERJEANTSON, S.W.; RANFORD, P.R.; KVIK, R.L.; KOHONEN-CORISH, N.R.J.; MOHAN, V.; RAMACHADRAN, A.; SNCHALATHA, C.; *et al.* : **HLA DR and DQ DNA genotyping in insulin-dependent diabetes patients in South India.** Dis. Markers. 1987; 101-108.
- SIBLEY, R.K.; SUTHERLAND, D.E.K.; GOLTZ, F.; MICHAEL, A.F. : **Recurrent diabetes Mellitus in the pancreas iso-and allograft; a light and electron microscopic and Immunohistochemical analysis of four cases.** Lab. Invest. 1985: 53: 132-144
- SOLIMENA, M.; FOLLI, F.; APARISI, R.; POZZA, G.; DECAMILLI, P. : **Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome.** New Engl. J. Med. 1990; 322: 1555-1560
- SRIKANTA, S.; GANDA, O.P.; EISENBARTH, G.S.; SOELDNER, J.S. : **Islet cell antibodies**

And beta cell function in monozygotic triplets and twins initially discordant for type I diabetes Mellitus. New Engl. J. Med. 1983; 308: 322-325.

SRIKANTA, S.; GANDA, O.P.; JACKSON, R.A.; *et al.* : **Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction.** Ann. Intern. Med. 1983; 99: 320-326.

STROMINGER, J.L. : **Biology of the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) system and a hypothesis regarding the generation of autoimmune disease.** F. Clin. Invest. 1986; 77:1411-1415.

SVEJGAARD, A.; PLATZ, P. ; RYDER, L.P.: **Insulin-dependent diabetes mellitus.** In :TERASAKI, P.C.; ed. Histocompatibility Testing 1980. University of California Press, Los Angeles. 1980. pp. 638-656.

SVEJGAARD, A.; JAKOBSEN, K.S.; PLATZ, P.; RYDER, L.P.; NERUP, J.; CHRISTY, M.; BORCH, J.; PARVING, H.H.; DECKERT, T.; MOBSTED-PEDERSEN, L.; KUHL, M.C.; BUSCHARD, K.; GREEN, A.: **HLA associations in insulin – dependent diabetes: search for heterogeneity in different groups of patients from a homogeneous population.** Tissue Antigens. 1986; 28: 237-244.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. : **HLA and insulin-dependent diabetes: An Overview.** Genetic Epidemiology. 1988; 6: 1-14.

THOMSEN, N.; PLATZ, P.; ANDERSEN, O.O.; CHRISTY, N.; LYNGSOR, J.; NERUP, J.; RASMUSSEN, K.; RYDER, L.P.; NIELSEN, L.S.; SVEJGAARD, A. : **MLC typing in juvenile diabetes mellitus and idiopathic Addison disease.** Transplant Rev. 1975; 22:125-147.

THOMSON, G.; ROBINSON, W.P.; KUHNER, M.K.; *et al.* : **Genetic heterogeneity, models of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus.** Am. J. Hum. Genet. 1988; 43: 700-816.

THORSBY, E.; RONNINGEN, K.S. : **Particular HDL-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type I (insulin-dependent) diabetes mellitus.** Diabetologia. 1993; 36: 371-377.

TIWARI, L.T.; TERASAKI, P.I. : **HLA and disease associations.** In Tiwari, Terasaki Springer, Berlin, 1985; pp185-210 .

TODD, J.A.; BELL, J.I.; MCDEVITT, H.O. : **HLA - DQ beta gene contribution to susceptibility and resistance to insulin – dependent mellitus.** Nature. 1987; 329: 599-604.

TODD, J.A.; AITMAN, T.J.; CORNALL, R.J.; *et al.* : **Genetic analysis of autoimmune type I**

- diabetes mellitus in mice.** Nature. 1991; 351: 542-547.
- TODD, J.A.; BAIN, S.C. : **A practical approach to identification of susceptibility genes for IDDM.** Diabetes. 1992; 41: 1029-1034.
- TRUCCO, M.: **To be or not to be ASP 57, that is the question.** Diabetes Care. 1992; 15: 705-715.
- VERGI, C.F.; GIANANI, R.; YU, L.; PIETROPAOLO, M.; SMITH, T.; JACSON, R.A.; SOELDNER, J.S.; EISENBARTH, G.S. : **Late progression to diabetes and evidence for chronic-B-cell autoimmunity in identical twins of patients with type I diabetes.** Diabetes. 1995; 44: 1176-1179.
- WANG, K.; ABRAMS, S.I.; LOH, D.Y.; HSIEH, C.S.; MURPHY, K.M.; RUSSEL, J.H.: **Separation of CD4+ functional responses by peptide dose in Th1 and Th2 subsets expressing the sm transgenic antigen receptor .** Cell Immunol. 1993; 148: 357-370.
- WASSMUTH, R.; LERNMARK, A. : **The genetics of susceptibility to diabetes.** Clin. Immunol Immunopath. 1989; 53: 358-399.
- WHITTINGHAM, S.; MACKAY, I.R.; MATHEWS, J.D. : **HLA Gm interactions: clinical implications.** Clin. Immunol. Allergy. 1984; 4: 623-639.
- WOLF, E.; SPENCER, K.M.; CUDWORTH, A.G. : **The genetic susceptibility to type I (insulin-dependent) diabetes: analysis of the HLA-DR association.** Diabetologia. 1983; 24: 224-230.